

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :

A61K 9/127

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/17255

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

30. April 1998 (30.04.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP96/04526

(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Oktober 1996 (17.10.96)

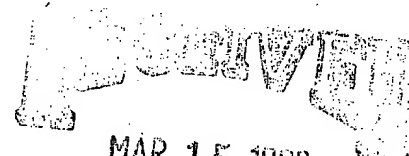
(71)(72) Anmelder und Erfinder: CEVC, Gregor [DE/DE];  
Erich-Kästner-Weg 16, D-85551 Heimstetten (DE).

(74) Anwalt: MAIWALD, Walter, Maiwald & Partner, Poccistrasse  
11, D-80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, IL, JP, KR, NZ,  
US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.



DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL

(54) Title: PREPARATION FOR THE TRANSPORT OF AN ACTIVE SUBSTANCE ACROSS BARRIERS

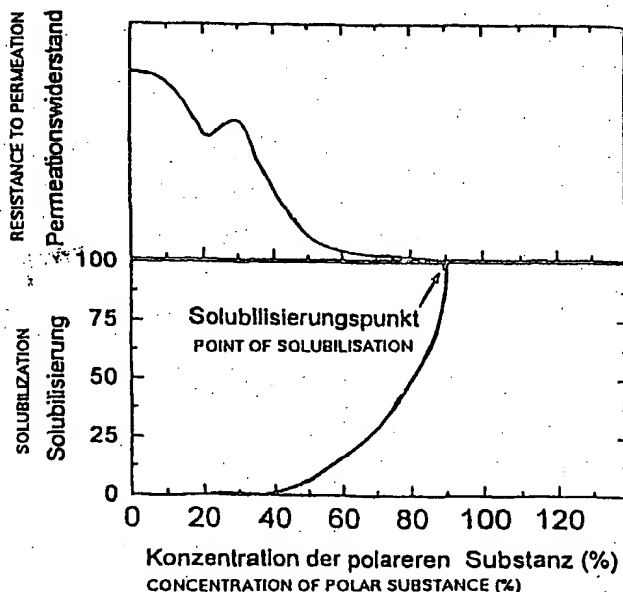
(54) Bezeichnung: PRÄPARAT ZUM WIRKSTOFFTRANSPORT DURCH BARRIEREN

(57) Abstract

Preparation for the application of an active substance in the form of minute droplets, especially liquid droplets with a membrane-type sheath of at least one or more layers of amphiphilic molecules or an amphiphilic carrier substance, especially for the transport of an active substance into and through natural barriers and constrictions such as skin and the like. The preparation has no point of solubilization or the preparation composition is at maximum permeation capacity far from solubilization point. The preparation contains at least two components whose solubility in suspending agents of the preparations, generally water, differs by at least a factor of 10.

(57) Zusammenfassung

Präparat zur Wirkstoffapplikation in Form kleinster Tröpfchen, insbesondere mit einer membranartigen Hülle aus einer oder wenigen Lagen amphiphiler Moleküle bzw. mit einer amphiphilen Trägersubstanz versehenen Flüssigkeitströpfchen, insbesondere zum Transport des Wirkstoffes in und durch natürliche Barrieren und Konstriktionen wie Häute und dergleichen. Das Präparat weist keinen Solubilisierungspunkt auf oder die Präparatzusammensetzung ist bei maximaler Permeationsfähigkeit weit vom Solubilisierungspunkt entfernt. Das Präparat weist einen Gehalt von mindestens zwei Komponenten auf, die sich in ihrer Löslichkeit im Suspensionsmedium der Präparate, üblicherweise Wasser, um mindestens de Faktor 10 unterscheiden.



### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON &amp; KAPPEL

Präparat zum Wirkstofftransport durch Barrieren

5

Die Erfindung betrifft neue Präparate zur Applikation von Wirkstoffen in Form kleinster in einem flüssigen Medium suspendierbarer Flüssigkeitströpfchen mit einer membranartigen Hülle aus einer oder wenigen Moleküllagen, die einen Wirkstoff umfassen und insbesondere zum Transport des Wirkstoffes durch Barrieren, beispielsweise natürliche Permeabilitätsbarrieren und Konstriktionen in Häuten, Schleimhäuten, Organen und dergleichen, geeignet sind.

15 Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung solcher Präparate, insbesondere zur nichtinvasiven Verabreichung von Wirkstoffen.

Die Applikation von Wirkstoffen wird häufig durch natürliche Barrieren wie Häute eingeschränkt, die ein ausreichendes Einbringen von Wirkstoffen verhindern, da sie für Wirkstoffe zu wenig durchlässig sind. Aufgrund der Permeationsbarriere der Haut müssen z.B. die meisten gängigen Therapeutika entweder peroral oder parenteral (i.v., i.m., i.p.) verabreicht werden. Intrapulmonale und intranasale Anwendungen von Aerosolen, der Einsatz von Rektalzäpfchen, die Applikation von Schleimhautgelen, ocularen Präparaten usw. lassen sich nur an bestimmten Stellen und nicht mit allen Wirkstoffen realisieren. Das Einbringen von Wirkstoffen in das pflanzliche Gewebe unterliegt aufgrund der kutikulären Wachsschichten noch stärkeren Beschränkungen.

Nichtinvasive Applikationen von Wirkstoffpräparaten, die geeignet sind, solche Permeabilitätsbarrieren zu durchdringen, wären in vielen Fällen vorteilhaft. Bei Mensch und Tier würde beispielsweise eine perkutane Applikation solcher Präparate die verabreichten Wirkstoffe vor der

Zersetzung im Gastrointestinaltrakt schützen und gegebenenfalls eine modifizierte Agensverteilung im Körper zur Folge haben; sie kann die Pharmakokinetik der Droge beeinflussen und sowohl häufige, als auch einfache, nichtinvasive Behandlung erlauben (Karzel K., Liedtke, R.K. (1989) *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 39, 1487 - 1491). Bei Pflanzen könnte eine verbesserte Penetration durch oder in die Kuticula die für eine gewünschte Wirkung erforderliche Wirkstoffkonzentration senken und zusätzlich die Umweltbelastung signifikant herabsetzen (Price, C.E. (1981) In: *The plant cuticle* (D.F. Cutler, K.L. Alvin, C.E. Price, Hrsgb.), Academic, New York, pp 237 - 252).

Bestrebungen, die Hautdurchlässigkeit durch geeignete Maßnahmen zu beeinflussen, sind vielfach besprochen worden (siehe z.B. Karzel und Liedtke, op. cit.). Besonders erwähnenswert sind z.B. Jet-injektion (Siddiqui & Chien (1987) *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.* 3, 195 - 208.), der Einsatz von elektrischen Feldern (Burnette & Ongpipattanakul (1987) *J. Pharm. Sci.* 76, 765 - 773) oder die Verwendung von chemischen Additiven, wie z.B. von Lösungsmitteln oder Tensiden. Eine lange Liste von Hilfsstoffen, die zwecks Erhöhung der Penetration eines wasserlöslichen Wirkstoffes (Nolaxon) in die Haut getestet wurden, ist z.B. in der Arbeit von Aungst et. al. (1986, *Int. J. Pharm.* 33, 225 - 234) enthalten.

Das bekannteste Verfahren zur Erhöhung der Wirkstoffpenetration durch die Haut oder Schleimhaut beruht auf der Verwendung von Penetrationsverstärkern. Solche Penetrationsverstärker umfassen nichtionische Stoffe (langkettige Alkohole, Tenside, zwitterionische Phospholipide), anionische Stoffe (besonders Fettsäuren), kationische langkettige Amine, Sulfoxide sowie diverse Aminoderivate; sowie amphothere Glycinate und Betaine. Trotz allem ist jedoch das Problem der Wirkstoffpenetration in die Haut bisher nicht - oder nicht befriedigend - gelöst worden.

MAR 15 1999

## DAVIDSON, DAVIDSON &amp; KAPPEL

Ein Übersicht der Maßnahmen, die zwecks Erhöhung der Wirkstoffpenetration durch die pflanzliche Kuticula eingesetzt werden, ist in der Arbeit von Price (1981, op. cit.)  
5 zusammengefaßt.

Die bisher ausschließlich occlusiv verwendeten Penetrationsverstärker erhöhen die Penetrationsfähigkeit an der Permeabilitätsbarriere der Haut- oder Schleimhautoberfläche, indem sie die Fluidität eines Teils der Lipide in  
10 dieser Barriere erhöhen. Wenn chemische Penetrationsverstärker verwendet wurden, ist es bisher üblich gewesen, diese dem wirkstoffhaltigen Gemisch einfach hinzuzufügen; lediglich im Falle von menschlicher Haut wurden Additiva  
15 manchmal auch vorab, in Form einer organischen Lösung, aufgetragen. Diese Darbringungsform hing mit den bisher untersuchten und diskutierten Wirkungsprinzipien von Additiven zusammen: Im allgemeinen ging man davon aus, daß die verstärkte Agenspenetration einerseits auf der Auf-  
20 weichung (Fluidisierung) der Haut basiert (Golden et. al., (1987) J. Pharm. Sci. 76, 25 - 28). Diese Hautaufweichung geht in der Regel mit einer Zerstörung der Hautoberfläche und ihren schützenden Barriereeigenschaften einher und ist folglich unerwünscht. Andererseits wurde gezeigt, daß  
25 manche Wirkstoffe durch die Haut in Form von niedrigmolekularen Komplexen mit den Zusatzmolekülen permeieren (Green et. al., (1988) Int. J. Pharm. 48, 103 - 111).

Von diesen Konzepten abweichende Vorschläge, wie die  
30 epidermale Anwendung von Lipidsuspensionen, brachten bisher wenig Verbesserung. Solche Suspensionen enthalten typischerweise Vesikel oder O/W- bzw. W/O-Emulgatoren.

Der von mehreren Autoren theoretisch diskutierte perkutane  
35 Einsatz von Trägern auf Lipidbasis, den Liposomen (Patel, Bioch. Soc. Trans., 609th Meeting, 13, 513 - 517, 1985, Mezei, M. Top. Pharm. Sci. (Proc. 45th Int. Congr. Pharm.

Sci. F.I.P.,) 345 - 58 Elsevier, Amsterdam, 1985) zielte hauptsächlich auf die Beeinflussung der Wirkstoffkinetik. Es war vom Einsatz herkömmlicher Lipidvesikel die Rede, die die Haut nicht oder extrem unvollkommen passieren, wie  
5 in dieser Anmeldung gezeigt ist. Der Einsatz von Liposomen, Niosomen oder anderen üblichen Lipidvesikeln ist daher auf äußere Hautschichten beschränkt.

Die japanische Patentanmeldung JP 61/271204 A2 [86/271204]  
10 griff die Verwendung von Liposomen durch Verwendung von Hydrochinon-Glucosidal als wirkstoffstabilitätserhöhenden Stoff im ähnlichen Sinne auf.

Als Verbesserung wurde in der WO 87/1938 A1 vorgeschlagen,  
15 die wirkstoffbeladenen Lipidvesikel zusammen mit einem Gelbildner in Form von 'transdermal patches' zu verwenden. Die Wirkzeit konnte auf diese Weise verlängert, die Penetrationsfähigkeit des Wirkstoffes jedoch kaum erhöht werden. Durch massiven Einsatz von penetrationsförderndem  
20 Polyethylenglycol und Fettsäuren zusammen mit Lipidvesikeln gelang es Gesztes und Mezei (1988, Anesth. Analg. 67, 1079 - 1081) eine lokale Analgesie mit lidocainhaltigen Trägern zu erreichen, allerdings erst nach mehreren Stunden occlusiver Applikation und in geringem Maßstab.

25 Weiterhin wurden Trägerformulierungen aufgefunden, die für eine Penetration in und durch Permeabilitätsbarrieren geeignet sind. So konnten die Ergebnisse von Gesztes und Mezei durch eine Spezialformulierung, die filtrierte,  
30 detergenshaltige Lipidvesikel (Liposomen) mit einem deklarierten optimalen Lipid/Tensid Gehalt von 1-40/1, in der Praxis zumeist um 4/1 aufweisen, erstmalig dramatisch übertroffen werden.

35 Weiterhin wurde erkannt, daß alle solchen Träger für eine Penetration in und durch die Permeabilitätsbarrieren geeignet sind, die genügend elastisch sind, um durch die



## DAVIDSON, DAVIDSON &amp; KAPPEL

Konstriktionen der Barriere, z.B. der Haut, dringen zu können. Dies insbesondere dann, wenn die Träger nach der Applikation selbst einen Gradienten an der Permeabilitätsbarriere aufbauen, da sie in diesem Fall zur spontanen Penetration der Permeabilitätsbarriere tendieren. In den Patentanmeldungen DE 41 07 152 und DE 41 07 153 sind erstmalig Träger, im folgenden als Transfersomen bezeichnet, beschrieben, die zum Wirkstofftransport durch nahezu beliebige Permeationshindernisse tauglich sind.

10

Transfersomen unterscheiden sich von den bisher für die topische Anwendung beschriebenen Liposomen und von sonstigen verwandten Trägern in mehreren Grundeigenschaften.

Transfersomen sind in der Regel viel größer als herkömmliche mizellenartige Trägerformulierungen und unterliegen daher anderen Diffusionsgesetzen. So ist die Permeabilität keine lineare Funktion des Antriebsdruckes, wie bei Liposomen, d.h. bei Transfersomen nimmt die Permeabilität im Gegensatz zu Liposomen oder anderen bekannten ähnlichen Trägersystemen bei steigendem Druck überproportional bzw. nicht linear zu. Ferner können mittels Transfersomen durch Konstriktionen eingebrachte Substanzen im Menschen fast 100% des maximal erreichbaren biologischen oder therapeutischen Potentials entfalten. So erreichen beispielsweise regelmäßig mehr als 50%, häufig mehr als 90%, der perkutan applizierten transfersomal verpackten Wirkstoffe ihren Bestimmungsort im Körper. Diese in der EP 91 114 163 und PCT/EP 91/01596 beschriebenen Transfersomen weisen einen Gehalt einer randaktiven Substanz auf, der bis zu 99 Mol% des Gehaltes und wenigstens 0,1 Mol% dieser Substanz entspricht, durch den der Solubilisierungspunkt der Tröpfchen erreicht wird.

30

Als entscheidende Bedingung für die gesteigerte Penetrationseffizienz der Transfersomen gegenüber Liposomen oder anderen ähnlichen bekannten Trägern wurde dabei der Gehalt an randaktiver Substanz angegeben, der eine optimierte An-

35

näherung an die Solubilisierungsgrenze der Transfersomen bewirkt, (d.h. an einen Gehalt an randaktiver Substanz, der die Transfersomen vollkommen destabilisiert), damit sie genügend elastisch sind, um die Konstriktionen in der  
5 Barriere, z.B. in der Haut, durchdringen zu können.

Es wäre nun höchst wünschenswert, bei der Formulierung solch hochgradig permeationsfähiger Präparate nicht an die genannten Gehaltsbereiche gebunden zu sein.

10

Es ist daher eine Aufgabe der Erfindung, Transfersomen, die entweder keinen Solubilisierungspunkt haben oder weit entfernt vom Solubilisierungspunkt sind, für die Applika-  
tion von Wirkstoffen anzugeben, die deren schnellen und  
15 wirksamen Transport durch Barrieren und Konstriktionen gestattet.

Aufgabe der Erfindung ist es weiterhin, Transfersomen zum Wirkstofftransport durch menschliche, tierische und  
20 pflanzliche Barrieren zur Verfügung zu stellen, die eine verbesserte Verfügbarkeit des Wirkstoffes am Wirkungsort ermöglichen.

Aufgabe der Erfindung ist es weiterhin, ein Verfahren zur  
25 Herstellung solcher Transfersomen zum Wirkstofftransport anzugeben.

Zur Lösung dieser Aufgabe dienen die Merkmale der unabhängigen Ansprüche.

30

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß auch Transferso-  
35 menpräparate gebildet werden können, die zur Applikation bzw. zum Transport von wenigstens einem Wirkstoff, insbesondere für medizinische und biologische Zwecke, in und

durch natürliche Barrieren und Konstruktionen wie Häute und dergleichen geeignet sind und die Form von in einem flüssigen Medium suspendierbaren Flüssigkeitströpfchen haben, die mit einer membranartigen Hülle aus einer oder  
5 wenigen Lagen amphiphiler Trägersubstanz versehen sind, wobei die Trägersubstanz wenigstens zwei (physiko)chemisch verschiedene amphiphile Komponenten umfaßt, die sich in ihrer Löslichkeit im Suspensionsmedium der Transfersomen (üblicherweise Wasser), um einen Faktor von mindestens 10  
10 unterscheiden, wenn deren Gehalt an solubilisierenden Komponenten weniger als 0,1 Mol.-% bezogen auf den Gehalt an diesen Substanzen beträgt, bei dem der Solubilisierungspunkt der umhüllten Tröpfchen erreicht wird oder die amphiphilen Komponenten so ausgewählt sind, daß konzentra-  
15 tionsunabhängig überhaupt keine Solubilisierung der umhüllten Tröpfchen erfolgt.

Die erfindungsgemäßen Präparate, im folgenden wiederum als Transfersomen bezeichnet, können aus beliebigen amphiphilen Komponenten hergestellt werden, die ausreichend  
20 unterschiedliche Löslichkeiten aufweisen. Diese Bedingung wird erfüllt, wenn die Löslichkeiten der einzelnen Trägerkomponenten des Transfersoms im Suspensionsmedium sich um mindestens den Faktor  $10^1$  (und bis zu  $10^7$ ) unterscheiden.  
25 Die Erfüllung dieser Bedingung sorgt dafür, daß die membranartige Hülle der resultierenden Transfersomen unter dem Einfluß eines Gradienten, beispielsweise an einer intakten natürlichen Barriere wie der Haut, eine gesteigerte Deformierbarkeit besitzt. Diese Eigenschaft befähigt die  
30 erfindungsgemäßen Transfersomen zur Penetration durch die Konstriktionen in beliebigen Permeabilitätsbarrieren.

Die Fähigkeit der erfindungsgemäßen Präparate, durch Konstriktionen zu permieren, beträgt mindestens 0,01  
35 Promille, vorzugsweise jedoch mehr als 1 Promille der Permeabilität von kleinen, im wesentlichen ungehindert permeierten Molekülen.

RECEIVED  
MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL

Der Begriff Löslichkeit, wie hier verwendet, bezieht sich nach gegenwärtiger Kenntnis (aber ohne an eine theoretisch-wissenschaftliche Definition gebunden sein zu müssen) auf sogenannte echte Lösungen. Jedenfalls wird bei Erreichen einer jeweiligen Grenzkonzentration eine Löslichkeitsgrenze beobachtet, die durch die Bildung eines Niederschlags, die Bildung von Kristallen, die Bildung von Suspensionen oder durch die Bildung von molekularen Aggregaten wie beispielsweise Micellen definiert ist. Für selbstaggregierende Moleküle entspricht die Löslichkeitsgrenze typischerweise der kritischen Selbstaggregationskonzentration (CAC). Für micellenbildende Moleküle entspricht die Löslichkeitsgrenze typischerweise der kritischen Micellenbildungskonzentration (CMC).

Die erfindungsgemäßen Transfersomen unterscheiden sich erheblich von den bisher beschriebenen Transfersomen. Insbesondere unterscheiden sich die Transfersomen der vorliegenden Anmeldung von bekannten Transfersomen dadurch, daß die Transfersomen aus Kombinationen beliebiger Komponenten, unabhängig von ihrer Solubilisierungsfähigkeit, gebildet werden können.

Außerdem weisen die erfindungsgemäßen Transfersomen eine gegenüber den bekannten Transfersomen (cf. Patentanmeldungen WO 92703122 und EP 475 160) noch verbesserte Stabilität auf, da die Transfersomenzusammensetzung nicht nahe am Solubilisierungspunkt liegt.

30

Figur 1 zeigt die Abnahme des Permeationswiderstandes an einer Barriere in Abhängigkeit von der Konzentration randaktiver Substanz bezüglich der Annäherung an den Solubilisierungspunkt bei im Stand der Technik beschriebenen Transfersomen, (wobei jedoch dieser Solubilisierungspunkt nicht erreicht wird).

Figur 2 zeigt bei erfindungsgemäßen Transfersomen die Abnahme des Permeationswiderstandes an einer Barriere in Abhängigkeit von der Komponenten-Konzentration bezüglich der Annäherung an einen theoretischen, in der Praxis nicht zu erreichenden Solubilisierungspunkt .

Figur 2 zeigt deutlich, daß für die Komponentensysteme der erfindungsgemäßen Transfersomen keinen Solubilisierungspunkt existiert oder der Solubilisierungspunkt bei Erreichen der maximalen Permeationsfähigkeit noch weit entfernt ist.

Die erfindungsgemäßen Transfersomen öffnen somit einen eleganten, einheitlich und allgemein nützlichen Weg für den Transport von diversen Wirkstoffen in oder durch Permeabilitätsbarrieren. Diese neu entdeckten Wirkstoffträger eignen sich für den Einsatz in Human- und Tiermedizin, Dermatologie, Kosmetik, Biologie, Biotechnologie, Agrartechnologie und in anderen Gebieten.

Ein Transfersom zeichnet sich ferner durch seine Fähigkeit aus, unter der Wirkung eines Gradienten durch und/oder in Permeabilitätsbarrieren zu dringen bzw. diffundieren zu können und dabei Stoffe, insbesondere Wirkstoffe, zu transportieren. Diese Fähigkeit ist insbesondere in der nichtlinearen Permeationsfähigkeit versus Gradient-Kurve leicht zu erkennen und zu quantifizieren.

Ein solches Transfersom setzt sich erfindungsgemäß aus mehreren bis vielen Molekülen zusammen, die physiko-chemisch, physikalisch, thermodynamisch und häufig funktionell eine Einheit bilden. Die optimale Transfersomengröße ist dabei eine Funktion der Barrierecharakteristika. Sie hängt auch von der Polarität (Hydrophilie), Mobilität (Dynamik) und Ladung sowie von der Elastizität der Transfersomen(oberfläche) ab. Ein Transfersom ist vorteilhaft zwischen 10 und 10.000 nm groß.

RECEIVED

MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON & KATTEL

Für eine dermatologischen Applikationen werden erfindungs-  
gemäß vorzugsweise Transfersomen in der Größenordnung von  
50 bis 10.000 nm, häufig von 75 bis 400 nm, besonders häufig  
5 von 100 bis 200 nm verwendet.

Für die Applikationen an Pflanzen werden zweckmäßig zu-  
meist relativ kleine Transfersomen, vorwiegend mit einem  
Durchmesser unter 500 nm eingesetzt.

10

Der Vesikelradius der Präparat-Tröpfchen (Transfersomen)  
beträgt ungefähr von 25 bis 500, vorzugsweise von 50 bis  
200 und besonders vorzugsweise von 80 bis 180 nm.

15 Für erfindungsgemäße Transfersomen aus beliebigen Amphi-  
philen werden bevorzugt eine oder mehrere Komponenten mit  
einer Wasserlöslichkeit zwischen  $10^{-10}$  M und  $10^{-6}$  M und ein  
oder mehrere Komponenten mit einer Wasserlöslichkeit zwi-  
schen  $10^{-6}$  M und  $10^{-3}$  M kombiniert. Alternativ kann man die  
20 kombinierbaren amphiphilen Komponenten einander auch über  
ihre HLB-Werte zuordnen, wobei der Unterschied zwischen  
den HLB-Werten beider Komponenten vorzugsweise bis 10,  
häufig zwischen 2 und 7 und besonders häufig 3-5 beträgt.

25 Die Penetrationsfähigkeit der erfindungsgemäßen Trans-  
fersomen kann anhand von Vergleichsmessungen gegenüber  
Referenzteilchen oder Molekülen bestimmt werden. Die ver-  
wendeten Referenzteilchen sind deutlich kleiner als die  
Konstruktionen in der Barriere und somit maximal permea-  
30 tionsfähig. Vorzugsweise soll sich die Transfersomenper-  
meationsrate durch eine Testbarriere ( $P_{\text{Transf.}}$ ) von der  
Permeationsrate der Vergleichsstoffe  $P_{\text{Refer}}$  (z.B. Wasser),  
35 wenn die Barriere selbst der Bestimmungsort ist, um nicht  
mehr als einen Faktor zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-3}$  unterscheiden.  
Wenn ein relativ gleichmäßiger und langsamer Material-  
transport durch die Barriere gewünscht ist, soll das ange-  
gebene Verhältnis zwischen  $10^{-4}$  und 1 liegen. Maximale

Penetrationsfähigkeit ist gegeben, wenn das Verhältnis aus  $P_{\text{Transf.}}/P_{\text{Refer.}}$  größer als  $10^{-2}$  ist. Diese Angaben beziehen sich auf Transfersomen, die die Konstriktion größtmäßig um mehr als einen Faktor 2 und weniger als 4 überragen. Mit zunehmenden Größenunterschied, Träger/Konstriktion, d.h. bei einem Faktor  $> 4$ , können die  $P_{\text{Transf.}}/P_{\text{Refer.}}$  - Werte entsprechend kleiner sein.

Transfersomen gemäß dieser Anmeldungen können aus einer oder mehreren Komponenten bestehen. Am häufigsten verwendet man ein Gemisch von Grundsubstanzen. Geeignete Grundsubstanzen umfassen Lipide und andere Amphiphile, sowie hydrophile Flüssigkeiten; diese können mit den Wirkstoffmolekülen in bestimmten Verhältnissen gemischt werden, die sowohl von der Wahl der Substanzen als auch von ihren absoluten Konzentrationen abhängig sind.

Allgemein weisen die Präparate einen Gehalt von mindestens zwei amphiphilen Komponenten unterschiedlicher Löslichkeit, zur Bildung einer membranartigen Hülle um eine Tröpfchenmenge hydrophiler Flüssigkeit auf, wobei der Wirkstoff in der membranartigen Hülle, beispielsweise einer Doppelmembran und/oder in der hydrophilen Flüssigkeit enthalten ist. Die Wirkstoff-Träger-Assoziierung kann auch wenigstens teilweise erst nach der Bildung von transfersomenartigen Tröpfchen erfolgen.

Wenn die Transfersomen nicht von sich aus ausreichend deformierbar sind und ihre Permeationsfähigkeit durch den Zusatz von randaktiven Stoffen erreicht werden soll, entspricht die Konzentration dieser Stoffe weniger als 0,1 Mol.-% der Menge, die für eine Solubilisierung der Transfersomen erforderlich wäre, oder aber diese Solubilisierung ist im praktisch relevanten Konzentrationsbereich gar nicht erreichbar.

RECEIVED

MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL  
ERSATZBLATT (REGEL 26)

Die erfindungsgemäßen Transfersomen sind zum Wirkstofftransport durch fast beliebige Permeationshindernisse tauglich, z.B. für eine perkutane Medikamentenapplikation. Sie können wasserlösliche, amphiphile oder fettlösliche

5 Agenzien transportieren und erreichen je nach ihrer Zusammensetzung, Applikationsmenge und Form unterschiedliche Penetrationstiefen. Die Spezialeigenschaften, die einen Träger zum Transfersom machen, können sowohl von phospholipidhaltigen Vesikeln, als auch von anderen Amphiphil-

10 aggregaten erreicht werden. So kann mittels solcher Transfersomen ein Großteil von Wirkstoffmolekülen nicht nur in die Barriere, z.B. in die Haut, sondern auch durch die Barriere getragen und folglich systemisch aktiv werden. Transfersomen tragen z.B. Polypeptidmoleküle 1.000-

15 fach effizienter durch die Haut als das bisher mit Hilfe von permeationfördernden strukturlosen Stoffen möglich war.

#### DEFINITIONEN:

20

##### Lipide:

Ein Lipid im Sinne dieser Erfindung ist jede Substanz, die fettartige oder fettähnliche Eigenschaften besitzt. In der

25 Regel besitzt es einen ausgedehnten apolaren Rest (die Kette, X) und zumeist auch einen wasserlöslichen, polaren, hydrophilen Teil, die Kopfgruppe (Y) und hat die Grundformel 1.

30



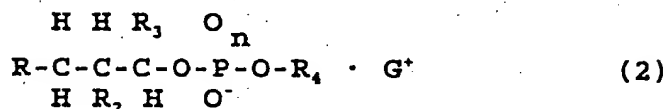
worin n größer oder gleich null ist. Lipide mit  $n = 0$  werden als apolare Lipide bezeichnet, Lipide mit  $n \geq 1$

35 werden polare Lipide genannt. In diesem Sinn können alle Amphiphile, wie z.B. Glyceride, Glycerophospholipide, Glycerophosphinolipide, Glycerophosphonolipide, Sulfolipide, Sphingolipide, Isoprenoidlipide, Steroide,



Sterine oder Sterole und kohlehydrathaltige Lipide allgemein als Lipide bezeichnet werden.

Ein Phospholipid ist beispielsweise eine Verbindung der Formel 2:



worin n und R<sub>1</sub> die unter Formel 2 genannten Bedeutungen haben, aber R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> nicht Wasserstoff, OH oder kurzkettiger Alkylrest sein kann und R<sub>2</sub> meist Wasserstoff oder OH ist.

R<sub>1</sub> ist außerdem durch Tri-kurzkettiges-Alkylammonio, z.B. Trimethylammonio, oder Amino substituiertes kurzkettiges Alkyl, z.B. 2-Trimethylammonioethyl (Cholinyl).

Ein Lipid ist vorzugsweise eine Substanz gemäß der Formel 2, worin n = eins, R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> Hydroxyacyl, R<sub>2</sub> Wasserstoff und R<sub>1</sub> 2-Trimethyl-ammonioethyl (das letztere entspricht der Phosphatidylcholinkopfgruppe), 2-Dimethylammonioethyl, 2-Methylammonioethyl oder 2-Aminoethyl (entsprechend Phosphatidylethanolaminkopfgruppe) darstellen.

Ein solches Lipid ist z.B. ein natürliches Phosphatidylcholin - veraltet auch Lecithin genannt. Es kann z.B. gewonnen werden aus Ei (reich an Arachidonsäure), Sojabohne (reich an C-18 Ketten), Kokosnuß (reich an gesättigten Ketten), Oliven (reich an einfach ungesättigten Ketten), Safran (Saflor) und Sonnenblumen (reich an n-6 Linoleinsäure), Leinsamen (reich an n-3 Linolensäure), aus Walfett (reich an einfach ungesättigten n-3 Ketten), Nachtkerze oder Primel (reich an n-3 Ketten). Bevorzugte natürliche Phosphatidylethanolamine (veraltet auch Kephalline genannt) stammen häufig aus Ei oder Sojabohnen.

RECEIVED

MAR 15 1999

ERSATZBLATT (REGEL 26)  
DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL

Außerdem sind als Lipide synthetische Phosphatidylcholine ( $R_1$  in der Formel 2 entspricht 2-Trimethylammoniummethyl), synthetische Phosphatidylethanolamine ( $R_1$  gleich 2-Aminoethyl), synthetische Phosphatidsäuren ( $R_1$  ist ein Proton) oder ihre Ester ( $R_1$  entspricht z.B. einem kurzkettigen Alkyl, wie Methyl oder Ethyl), synthetische Phosphatidylserine ( $R_1$  gleich L- oder D-Serin), oder synthetische Phosphatidyl(poly)alkohole, wie z.B. Phosphatidylinositol, Phosphatidylglycerol ( $R_1$  gleicht L- oder D-Glycerol) bevorzugt, worin  $R_1$  und  $R_2$  identische Acyloxyreste, z.B. Lauroyl, Oleoyl, Linoyl, Linoleoyl oder Arachinoyl bedeuten, z.B. Dilauroyl-, Dimyristoyl-, Dipalmitoyl-, Distearoyl-, Diarachinoyl-, Dioleoyl-, Dilinoyl-, Dilinolenyl-, Dilinoleoyl-, Dilinolinoyl, Dilininolenoyl- oder Diarachinoylphosphatidylcholin oder -ethanolamin, oder verschiedene Acylreste, z.B.  $R_1$  = Palmitoyl und  $R_2$  = Oleoyl, z.B. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-glycerophosphocholin; oder verschiedene Hydroxyacylreste, z.B.  $R_1$  = Hydroxypalmitoyl und  $R_2$  = Oleoyl usw. sind. Ferner kann  $R_1$  Alkenyl und  $R_2$  identische (Hydroxy)alkylreste bedeuten, wie z.B. Tetradecylhydroxy oder Hexadecylhydroxy, z.B. in Ditetradecyl- oder Dihexadecylphosphatidylcholin oder -ethanolamin,  $R_1$  kann Alkenyl und  $R_2$  Hydroxyacyl, z.B. ein Plasmalogen ( $R_1$  Trimethylammonioethyl), oder  $R_1$  ein Acyl z.B. Lauryl, Myristoyl oder Palmitoyl und  $R_2$  Hydroxy sein; so z.B. in natürlichen oder synthetischen Lysophosphatidylcholinen oder Lysophosphatidylglycerolen oder Lysophosphatidylethanolaminen, z.B. 1-Myristoyl- oder 1-Palmitoyllysophosphatidylcholin oder -phosphatidylethanolamin sein;  $R_3$  stellt häufig Wasserstoff dar.

Ein geeignetes Lipid im Sinne dieser Erfindung ist auch ein Lipid der Formel 2, worin  $n = 1$  ist,  $R_1$  einen Alkenylrest,  $R_2$  einen Acyl-amidorest,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  2-Trimethylammonioethyl (Cholinrest) darstellen. Ein solches Lipid ist unter dem Namen Sphingomyelin bekannt.

- Ein geeignetes Lipid ist außerdem ein Lysophosphatidylcholin-Analog, z.B. 1-Lauroyl-1,3-propandiol-3-phosphorylcholin, ein Monoglycerid, z.B. Monoolein oder Monomyristin, ein Cerebrosid, Ceramidpolyhexosid,
- 5 Sulfatid, Sphingoplasmalogen, ein Gangliosid oder ein Glycerid, welches keine freie oder veresterte Phosphoryl- oder Phosphonogruppe oder Phosphinogruppe in 3-Stellung enthält. Ein solches Glycerid ist beispielsweise ein Diacylglycerid oder 1-Al-kenyl-1-hydroxy-2-acylglycerid
- 10 mit beliebigen Acyl- bzw. Alkenylgruppen, worin die 3-Hydroxygruppe durch einen der genannten Kohlenhydratreste, z.B. einen Galactosylrest, verethert ist, wie z.B. in einem Monogalactosylglycerin.
- 15 Lipide mit erwünschten Kopf- oder Kettengruppen-Eigenschaften können auch auf biochemischem Wege, z.B. mittels Phospholipasen (wie Phospholipase A1, A2, B, C und besonders D), Desaturasen, Elongasen, Acyl-Transferasen usw. aus natürlichen oder synthetischen Prekursoren gebildet
- 20 werden.

- Ein geeignetes Lipid ist ferner ein jedes Lipid, welches in biologischen Membranen enthalten und mit Hilfe von apolaren organischen Lösungsmitteln, z.B. Chloroform,
- 25 extrahierbar ist. Zu solchen Lipiden gehören außer den bereits erwähnten Lipide beispielsweise auch Steroide, z.B. Oestradiol, oder Sterine, z.B. Cholesterin, beta-Sitosterin, Desmosterin, 7-Keto-Cholesterin oder beta-Cholestanol, fettlösliche Vitamine, z.B. Retinoide,
- 30 Vitamine, z.B. Vitamin A1 oder A2, Vitamin E, Vitamin K, z.B. Vitamin K1 oder K2 oder Vitamin D1 oder D3 usw.

- Die weniger lösliche(n) amphiphile(n) Komponente(n) umfaßt bzw. umfassen vorzugsweise ein synthetisches Lipid wie
- 35 Myristoleoyl-, Palmitoleoyl-, Petroselinyl-, Petroselaidyl-, Oleoyl-, Elaidyl-, cis- bzw. trans-Vaccenoyl-, Linolyl-, Linolenyl-, Linolaidyl-,

RECEIVED

MAR 15 1998

Octadecatetraenoyl-, Gondoyl-, Eicosaenoyl-,  
Eicosadienoyl-, Eicosatrienoyl-, Arachidoyl-, cis- bzw.  
trans-Docosaenoyl-, Doco-sadienoyl-, Docosatrienoyl-,  
Docosatetraenoyl-, Lauroyl-, Tri-decanoyl-, Myristoyl-,  
5 Pentadecanoyl-, Palmitoyl-, Heptadecanoyl-, Stearoyl- bzw.  
Nonadecanoyl-, Glycerophospholipid bzw. entsprechend  
kettenverzweigte Derivate oder ein entsprechendes Dialkyl-  
bzw. Sphingosinderivat, Glykolipid oder anderes Diacyl-  
bzw. Dialkyl-Lipid.

10

Die besser lösliche(n) amphiphile(n) Komponente(n) ist  
häufig von den oben aufgeführten weniger löslichen Kom-  
ponenten abgeleitet und zur Erhöhung der Löslichkeit mit  
einem Butanoyl-, Pentanoyl-, Hexanoyl-, Heptanoyl-,

15

Octanoyl-, Nonanoyl-, Decanoyl- oder Undecanoyl-,  
Substituenten oder mehreren, voneinander unabhängig  
ausgewählten Substituenten oder mit einem anderen zur  
Verbesserung der Löslichkeit geeigneten Stoff substituiert  
und/oder komplexiert, und/oder assoziiert.

20

Ein geeignetes Lipid ist ferner ein Diacyl- oder Dialkyl-  
glycerophosphoethanolaminazopolyethoxylon-Derivat, ein  
Didecanoylphosphatidylcholin oder ein  
Diacylphosphooligomaltobionamid.

25

Als Lipid im Sinne dieser Erfindung gilt auch eine jede  
andere Substanz (z.B. eine Poly- oder Oligoaminosäure),  
die eine geringe oder mindestens bereichsweise eine ge-  
ringe Löslichkeit in polaren Mitteln aufweist.

30

Alle Tenside ebenso sowie asymmetrische, und daher  
amphiphile, Moleküle oder Polymere, wie z.B. manche Oligo-  
und Poly-Kohlenhydrate, Oligo- und Polypeptide, Oligo- und  
Polynukleotide, viele Alkohole oder Derivate solcher

35 Moleküle gehören in diese Kategorie.

Die Polarität der verwendeten 'Lösungsmittel', Tenside, Lipide oder Wirkstoffe hängt von der effektiven, relativen Hydrophilie/Hydrophobie des jeweiligen Moleküls ab, ist aber auch von der Wahl der sonstigen Systemkomponenten und Randbedingungen im System (Temperatur, Salzgehalt, pH-Wert usw.) abhängig. Funktionelle Gruppen, z.B. Doppelbindungen im hydrophoben Rest, welche den hydrophoben Charakter dieses Restes abschwächen, erhöhen die Polarität; Verlängerung oder raumbeanspruchende Substituenten im hydrophoben Rest, z.B. im aromatischen Rest, erniedrigen die Polarität einer Substanz. Geladene oder stark polare Gruppen in der Kopfgruppe, bei gleichbleibender hydrophoben Kette, tragen normalerweise zu einer höheren Polarität und Löslichkeit der Moleküle bei. Direkte Bindungen zwischen den lipophilen und/oder amphiphilen Systemkomponenten haben eine entgegengesetzte Wirkung.

Als hochpolare Substanzen sind insbesondere alle in der EP-Patentanmeldung 475 160 als randaktiv genannten Verbindungen geeignet. Auf die Offenbarung dieser Patentanmeldung wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

#### WIRKSTOFFE:

Die erfindungsgemäßen Transfersomen eignen sich zur Applikation unterschiedlichster Wirkstoffe, insbesondere z. B. zu therapeutischen Zwecken. So können erfindungsgemäße Präparate insbesondere alle in der EP-Patentanmeldung 475 160 genannten Wirkstoffe enthalten.

Ferner können erfindungsgemäße Präparate als Wirkstoff ein Adrenocortostaticum,  $\beta$ -Adrenolyticum, Androgen oder Antiandrogen, Antiparasiticum, Anabolicum, Anästheticum oder Analgesicum, Analepticum, Antiallergicum, Antiarrhythmicum, Antiarteroscleroticum, Antiasthmaticum und/oder Bronchospasmolyticum, Antibioticum, Antidepressivum und/oder Antipsychoticum, Antidiabeticum,

RECEIVED

- Antidotum, Antiemeticum, Antiepilepticum,  
Antifibrinolyticum, Anticonvulsivum, Anticholinergicum,  
Enzym, Koenzym oder ein entsprechender Inhibitor, ein  
Antihistaminicum, Antihypertonicum, einen biologischen  
5 Aktivitätsinhibitor, ein Antihypotonicum, Antikoagulans,  
Antimycoticum, Antimyasthenicum, einen Wirkstoff gegen  
morbus Parkinson oder Alzheimer, ein Antiphlogisticum,  
Antipyreticum, Antirheumaticum, Antisepticum, Atem-  
analepticum oder Atemstimulanz, Broncholyticum,  
10 Cardi tonicum, Chemotherapeuticum, einen Coronardilatator,  
ein Cytostaticum, Diureticum, einen Ganglienblocker, ein  
Glucocorticoid, Grippetherapeuticum, Hämostaticum,  
Hypnoticum, Immunglobulin bzw. -fragment oder eine andere  
immunologische bzw. Rezeptor-Substanz, ein bioaktives  
15 Kohlehydrat(derivat), ein Kontrazeptivum, ein Migräne-  
mittel, ein Mineralcorticoid, einen Morphin-Antagonisten,  
ein Muskelrelaxans, Narcoticum, Neural- oder CNS-Thera-  
peuticum, ein Nukleotid, oder Polynukleotid, ein Neuro-  
lepticum, einen Neurotransmitter oder entsprechenden  
20 Antagonisten, ein Peptid (derivat), ein Ophthalmicum,  
(Para)-Sympaticomimeticum oder (Para)-Sympathicolyticum,  
ein Protein(derivat), ein Psoriasis/Neurodermitismittel,  
Mydriaticum, Psychostimulanz, Rhinologicum, Schlafmittel  
oder dessen Antagonisten, ein Sedativum, Spasmolyticum,  
25 Tuberlostaticum, Urologicum, einen Vasoconstrictor oder  
-dilator, ein Virustaticum oder ein Wundenheilmittel oder  
mehrere solcher Agentien enthalten.

Vorzugsweise ist der Wirkstoff ein nicht-steroidales Anti-  
30 inflammatoricum, beispielsweise Diclofenac, Ibuprofen oder  
ein Lithium-, Natrium-, Kalium-, Cäsium-, Rubidium-,  
Ammonium-, Monomethyl-, Dimethyl-, Trimethyl-Ammonium-  
oder Ethylammonium-Salz davon.

35 Außerdem können erfindungsgemäße Präparate als Wirkstoff  
eine wachstumsbeeinflussende Substanz für Lebewesen, ein  
Biozid, beispielsweise ein Insektizid, Pestizid, Herbizid,

Fungizid, oder einen Lockstoff, insbesondere ein Pheromon aufweisen.

5 Erfindungsgemäße Präparate können als weniger polare Komponente ein physiologisch verträgliches Lipid, bevorzugt aus der Klasse der Phospholipide, besonders bevorzugt aus der Klasse der Phosphatidylcholine, aufweisen, wobei der Wirkstoff beispielsweise Ibuprophen, Diclofenac oder ein Salz davon, die löslichere Komponente ist, gegebenenfalls  
10 mit einem Zusatz von weniger als 10 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtzusammensetzung des Präparates einer weiteren löslichen Komponente und wobei die Konzentration der löslicheren Komponente(n) typischerweise zwischen 0,01 Gew.-% und 15 Gew.-%, bevorzugt zwischen 0,1 Gew.-% und 10 Gew.-%  
15 und besonders bevorzugt zwischen 0,5 Gew.-% und 3 Gew.-%, und die Gesamtlipidkonzentration zwischen 0,005 Gew.-% und 40 Gew.-%, bevorzugt zwischen 0,5 Gew.-% und 15 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 1 Gew.-% und 10 Gew.-% beträgt.

20 Erfindungsgemäße Präparate können zusätzlich Konsistenzbildner, wie Hydrogele, Antioxidantien wie Probucol, Tocopherol, BHT, Ascorbinsäure, Desferroxamin und/oder Stabilisatoren wie Phenol, Cresol, Benzylalkohol und  
25 dergleichen umfassen.

Falls nicht anders spezifiziert, können alle angegebenen Substanzen, Tenside, Lipide, Wirkstoffe oder Zusatzstoffe mit einem oder mehreren chiralen Kohlenstoffatomen entweder als racemische Mischungen oder als optisch reine Enantiomere verwendet werden.  
30

#### WIRKPRINZIP:

35 Im Falle von Permeations-Barrieren kann der Wirkstofftransport durch solche Transfersomen bewältigt werden, die die folgenden Grundkriterien erfüllen:

MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL

- Die Transfersomen sollen einen Gradienten spüren oder aufbauen, der sie in oder über die Barriere treibt, z.B. von der Körperoberfläche in und unter die Haut, von der Blattoberfläche in das Blattinnere, von einer Seite der Barriere zur anderen;
- Der Permeationswiderstand, den die Transfersomen in der Barriere spüren, soll möglichst klein sein im Vergleich zu der treibenden Kraft;
- Die Transfersomen sollen fähig sein, in und/oder durch die Barriere zu permeieren, ohne dabei die eingeschlossenen Wirkstoffe unkontrolliert zu verlieren.

Ferner sollen die Transfersomen vorzugweise eine Kontrolle über die Wirkstoffverteilung, die Wirkstoffeffekte sowie den zeitlichen Wirkungsablauf erlauben. Sie sollen fähig sein, im Bedarfsfall das Material auch in die Tiefe der Barriere und über diese hinweg zu bringen und/oder einen solchen Transport zu katalysieren. Und nicht zuletzt sollen die Transfersomen den Wirkungsbereich und die Wirkungstiefe sowie - in günstigen Fällen - die Art der Zellen, Gewebsteile, Organe, oder Systemabschnitte, die erreicht oder behandelt werden, beeinflussen.

In erster Hinsicht kommen für die biologischen Anwendungen die chemischen Gradienten in Frage. Besonders geeignet sind die physiko-chemischen Gradienten, wie z.B. der (De)Hydratationsdruck (Feuchtigkeitsgradient) oder ein Konzentrationsunterschied zwischen dem Applikations- und Wirkungsort; aber auch elektrische oder magnetische Felder sowie thermische Gradienten sind in dieser Hinsicht interessant. Für technologische Anwendungen sind ferner der applizierte hydrostatische Druck oder ein bestehender Druckunterschied wichtig.

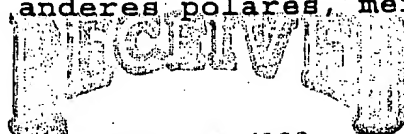


Um die zweite Bedingung zu erfüllen, müssen die Transfersomen auf der mikroskopischen Skala ausreichend 'dünnflüssig' sein, d.h. eine hohe mechanische Elastizität und Verformbarkeit und eine ausreichend niedrige Viskosität; nur dann können sie durch die Konstriktionen innerhalb der Permeabilitätsbarriere gelingen.

Der Permeationswiderstand nimmt verständlicherweise mit der Trägergröße ab. Aber auch die treibende Kraft ist häufig von der Trägergröße abhängig; bei größenunabhängigem Druck nimmt diese Kraft mit der Größe typischerweise ab. Darum ist die Übertragungseffizienz keine einfache Funktion der Größe, sondern weist häufig ein von der Wahl der Träger- und Wirkstoffe abhängiges Maximum auf.

Ferner spielt die Wahl der Trägersubstanzen, Wirkstoffe und Zusatzstoffe, sowie die applizierte Trägermenge oder Konzentration eine Rolle. Niedrige Dosierung führt meistens zu einer oberflächlichen Behandlung: Stoffe, die schlecht wasserlöslich sind, bleiben dabei zumeist in der apolaren Region der Permeabilitätsbarriere (z.B. in den Membranen der Epidermis) hängen; gut lösliche Wirkstoffe, die leicht aus den Trägern diffundieren, können eine andere Verteilung haben als die Träger; für solche Stoffe ist also auch die Durchlässigkeit der Transfersomen-Membran wichtig. Substanzen, die dazu neigen, aus den Trägern in die Barriere überzutreten, führen zu einer örtlich variablen Trägerzusammensetzung, usw. Diese Zusammenhänge sollen vor jeder Applikation überdacht und berücksichtigt werden. Bei der Suche nach Bedingungen, unter denen die einfachen Trägervesikel zu Transfersomen werden, kann die folgende Faustregel verwendet werden.

Als erstes werden zwei oder mehrere amphiphile Komponenten kombiniert, die sich in ihrer Löslichkeit im vorgesehenen Suspensionsmedium der Transfersomen, üblicherweise Wasser oder ein anderes polares, meist



MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON &amp; KAPPEL

wässriges Medium, um einen Faktor 10 bis  $10^7$ , vorzugsweise  $10^2$  und  $10^6$  und besonders bevorzugt zwischen  $10^3$  und  $10^5$ , unterscheiden, wobei die weniger lösliche Komponente eine Löslichkeit von  $10^{-10}$  bis  $10^{-6}$  und die besser lösliche Komponente eine Löslichkeit im Bereich von  $10^{-6}$  bis  $10^{-3}$  M aufweist. Die Löslichkeit der entsprechenden Komponenten, wenn nicht aus allgemein üblichen Nachschlagewerken bekannt, läßt sich beispielsweise durch herkömmliche Methoden zur Bestimmung der Sättigungsgrenze bestimmen.

- Als nächstes wird die Trägerzusammensetzung bzw. Konzentration der Komponenten im System so angepaßt, daß die Vesikel sowohl eine ausreichende Stabilität als auch eine ausreichende Deformierbarkeit, und daher zweckmäßige Permeationsfähigkeit, aufweisen. Unter Stabilität wird in dieser Anmeldung neben dem mechanischem "Zusammenhalt" auch verstanden, daß sich die Substanz-, insbesondere der Wirkstoffgehalt der Trägerzusammensetzung beim Transport, insbesondere beim Permeationsvorgang, nicht oder nicht wesentlich ändert. Die Position des gesuchten Optimums ist dabei von der Wahl der Komponenten abhängig.

- Abschließend werden die Systemparameter unter Berücksichtigung der angestrebten Applikationsmodi und Ziele nachoptimiert. Für eine rasche Wirkung ist hohe Permeationsfähigkeit erforderlich; für langsame Wirkstofffreisetzung eine allmähliche Barrieren-Penetration und entsprechend eingestellte Membranpermeabilität vorteilhaft; für die Tiefenwirkung ist eine hohe Dosis, für möglichst breite Verteilung eine nicht zu hohe Trägerkonzentration angeraten.

- Der Gehalt an amphiphilen Komponenten wird insbesondere so eingestellt, daß die Fähigkeit des Transfersomen-Präparates, durch Konstriktion

tionen zu permeieren mindestens 0,01 Tausendstel der Permeabilität von kleinen Molekülen (beispielsweise Wasser) beträgt. Die Penetrationsfähigkeit der erfindungsgemäßen Transfersomen kann anhand von Vergleichsmessungen gegenüber Referenzteilchen oder Molekülen bestimmt werden. Die verwendeten Referenzteilchen sind deutlich kleiner als die Konstriktionen in der Barriere und somit maximal permeationsfähig. Vorzugsweise soll die Transfersomenpermeationsrate durch eine Testbarriere ( $P_{\text{Transf.}}$ ) und die Permeationsrate der Vergleichsstoffe ( $P_{\text{Refer}}$ ) (z.B. Wasser), wenn die Barriere selbst der Bestimmungsort ist, sich um nicht mehr als um einen Faktor zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-3}$  unterscheiden.

In dieser Anmeldung werden relevante Eigenschaften von Transfersomen als Träger für die Lipidvesikel besprochen. Die meisten Beispiele beziehen sich beispielhaft auf die Träger aus Phospholipiden, wobei jedoch die allgemeine Gültigkeit der Schlußfolgerungen nicht auf diese Trägerklasse oder Moleküle beschränkt ist. Die Lipidvesikel-Beispiele illustrieren lediglich die Eigenschaften, die zur Penetration durch die Permeabilitätsbarrieren, wie z.B. Haut, benötigt werden. Dieselben Eigenschaften ermöglichen einen Trägertransport auch durch die tierische oder menschliche Epidermis, Schleimhäute, pflanzliche Kuticula, anorganische Membranen, usw.

Der wahrscheinliche Grund für die spontane Permeation von Transfersomen durch die 'Poren' in der Hornhautzellenschicht ist, daß diese auf einer Seite in einem wässrigen Kompartiment, der Subcutis, münden; die Transfersomen werden dabei durch den osmotischen Druck getrieben. Alternativ kann aber zusätzlich ein externer, z.B. hydrostatischer oder elektro-osmotischer Druck appliziert werden.

RECEIVED

ERSATZBLATT (REGEL 26)

MAR 15 1999

PERSONEN- UND SACHREGISTER

Je nach Vesikelmenge können nach einer perkutanen Applikation die Lipidvesikel bis in die Subkutis gelangen. Die Wirkstoffe werden dabei, je nach der Größe, Zusammensetzung und Formulierung der Träger oder Agenzien, entweder lokal freigesetzt, proximal angereichert, oder aber über die Lymphgefäße bzw. Blutgefäße weitergeleitet und über den Körper verteilt.

Manchmal ist es angebracht, den pH-Wert der Formulierung gleich nach der Herstellung oder unmittelbar vor der Anwendung anzupassen. Eine solche Anpassung soll die Zerstörung der System-komponenten und/oder der Wirkstoff-träger unter den anfänglichen pH-Bedingungen verhindern und die physiologische Verträglichkeit der Formulierung gewährleisten. Zur Neutralisierung werden zumeist physiologisch verträgliche Säuren oder Basen bzw. Pufferlösungen mit einem pH-Wert von 3-12, vorzugsweise 5 bis 9, besonders häufig 6-8, je nach dem Zweck und Ort der Applikation, verwendet. Physiologisch verträgliche Säuren sind beispielsweise verdünnte wässrige Mineralsäuren, wie z.B. verdünnte Salzsäure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure, oder organische Säuren, z.B. Alkancarbonsäuren, wie Essigsäure. Physiologisch verträgliche Laugen sind z.B. verdünnte Natronlauge, entsprechend ionisierte Phosphorsäure, usw.

Die Herstellungstemperatur wird normalerweise den eingesetzten Substanzen angepaßt und liegt für die wässrige Präparationen üblicherweise zwischen 0 und 95 °C. Vorzugsweise arbeitet man in einem Temperaturbereich von 18-70 °C; besonders bevorzugt für die Lipide mit fluiden Ketten ist der Temperaturbereich zwischen 15 und 55 °C, für die Lipide mit geordneten Ketten zwischen 45 und 60°C. Andere Temperaturbereiche sind für die nichtwässrigen Systeme oder für Präparationen, die Kryo- oder Hitzekonservantien enthalten, bzw. die in situ hergestellt werden, möglich.

Falls die Empfindlichkeit der Systemkomponenten das verlangt, können die Formulierungen kühl (z.B. bei 4°C) gelagert werden. Sie können auch unter Inertgas-, z.B. Stickstoffatmosphäre, hergestellt und aufbewahrt werden.

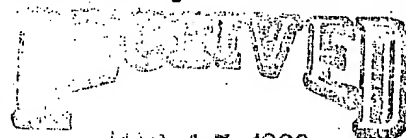
- 5 Die Lagerungsdauer kann durch die Verwendung von Substanzen ohne Mehrfachbindungen sowie durch das Eintrocknen und Verwendung von Trockensubstanz, die erst an Ort und Stelle aufgelöst und aufgearbeitet wird, weiter erhöht werden, insbesondere können die transfersomenartigen Tröpfchen
- 10 kurz vor der Anwendung aus einem Konzentrat oder Lyophilisat zubereitet werden.

- In den meisten Fällen findet die Applikation der Träger bei Raumtemperatur statt. Einsätze bei tieferen Temperaturen oder bei höheren Temperaturen mit synthetischen
- 15 Substanzen noch höhere Temperaturen sind indes durchaus möglich.

- Die Herstellung einer Transfersomensuspension kann mittels
- 20 mechanischer, thermischer, chemischer oder elektrischer Energiezufuhr erfolgen. So kann eine Transfersomenherstellung auf Homogenisierung oder Rühren basieren.

- 25 Eine Bildung von transfersomenartigen Tröpfchen kann durch Filtration bewirkt werden. Das dafür verwendbare Filtermaterial sollte eine Porengröße von 0,01 bis 0,8  $\mu\text{m}$ , insbesondere 0,05 bis 0,3  $\mu\text{m}$  und besonders bevorzugt 0,08 bis 0,15  $\mu\text{m}$  aufweisen, wobei gegebenenfalls mehrere Filter
- 30 hintereinandergeschaltet verwendet werden.

- Die Präparate können im voraus oder an Ort und Stelle der Anwendung vorbereitet werden, wie das z.B. in P 40 26 833.0-43 oder anhand mehrerer Beispiele im Handbuch
- 35 'Liposomes' (Gregoriadis, G., Hrsg., CRC Press, Boca Raton, Fl., Vols 1-3, 1987) im Buch 'Liposomes as drug carriers' (Gregoriadis, G., Hrsg., John Wiley & Sons, New



MAR 15 1999

DAVIDSON DAVIDSON &amp; KAPPEL

York, 1988), oder im Labor-atoriumshanduch 'Liposomes. A Practical Approach' (New, R., Oxford-Press, 1989) beschrieben ist. Falls erforderlich, kann eine Wirkstoff-suspension unmittelbar vor dem Gebrauch verdünnt oder  
5 aufkonzentriert (z.B. per Ultrazentrifugation oder Ultrafiltration) bzw. mit weiteren Zusatzstoffen vermengt werden. Dabei muß jedoch die Möglichkeit einer Verschiebung des Optimums für die Trägerpermeation ausgeschlossen oder einkalkuliert werden.

10 Die Transfersomen gemäß dieser Anmeldung sind als Träger von lipophilen Stoffen, z.B. fettlöslichen biologischen Wirkstoffen, Therapeutika und Giften, usw. geeignet; von einem großen praktischen Wert ist auch ihre Anwendung im  
15 Zusammenhang mit amphiphilen wasserlöslichen Substanzen, besonders wenn deren Mol-Masse größer als 1000 ist.

Die Transfersomen können ferner zur Stabilisierung von hydrolyseempfindlichen Stoffen beitragen und eine ver-  
20 besserte Verteilung von Agentien in der Probe und am Ort der Applikation ermöglichen, sowie einen günstigeren zeitlichen Verlauf der Wirkstoffwirkung gewährleisten. Die Grundsubstanz, aus der die Transfersomen bestehen, kann selbst eine vorteilhafte Wirkung haben. Die wichtigste  
25 Trägereigenschaft ist jedoch, den Materialtransport in und durch die Permeabilitätsbarriere zu ermöglichen.

Die beschriebenen Formulierungen sind erfindungsgemäß optimiert für die topische Applikation an - oder in der  
30 Nähe von - Permeabilitätsbarrieren. Besonders interessant dürfte das Auftragen auf die Haut oder auf die pflanzliche Kuticula sein. (Sie sind aber auch für eine orale (p.o.) oder parenterale (i.v. i.m. oder i.p.) Applikation gut geeignet, besonders wenn die Transfersomenzusammensetzungen so gewählt sind, daß die Verluste am Applika-  
35 tionsort klein sind.). Substanzen bzw. Komponenten, die am Applikationsort bevorzugt abgebaut, besonders stark auf-

genommen oder verdünnt werden, sind in letzter Hinsicht in Abhängigkeit vom Einsatzzweck besonders wertvoll.

Im medizinischen Bereich werden bevorzugt bis zu 50, häufig bis zu 10, besonders häufig weniger als 2.5 oder sogar weniger als 1 mg Trägersubstanz pro cm<sup>2</sup> Hautfläche aufgetragen; die optimale Menge hängt ab von der Trägerzusammensetzung, angepeilten Wirttiefe und Wirkdauer, sowie von dem Applikationsort. Im agrotechnischen Bereich liegen Applikationsmengen typischerweise niedriger, häufig unter 0.1 g pro m<sup>2</sup>.

Insbesondere beträgt der Gesamtgehalt an amphiphiler Substanz zur Applikation auf menschlicher und tierischer Haut zwischen 0,01 und 40 Gew.-% des Transfersoms, vorzugsweise zwischen 0,1 und 15 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 1 und 10 Gew.-%.

Zur Applikation bei Pflanzen beträgt der Gesamtgehalt an amphiphiler Substanz 0,000001 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise zwischen 0,001 und 1 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 0,01 und 0,1 Gew.-%.

Je nach der angestrebten Anwendung können die Formulierungen erfindungsgemäß auch geeignete Lösungsmittel bis zu einer Konzentration, die durch die jeweilige physikalische (keine Solubilisierung oder nennenswerte Optimumverschiebung), chemische (keine Beeinträchtigung der Stabilität), oder biologische bzw. physiologische (wenig unerwünschte Nebeneffekte) Verträglichkeit bestimmt wird.

Vorzugsweise kommen dabei unsubstituierte oder substituierte, z.B. halogenierte, aliphatische, cycloaliphatische, aromatische oder aromatisch-aliphatische Kohlenwasserstoffe, z.B. Benzol, Toluol, Methylenchlorid oder Chloroform, Alkohole, z.B. Methanol oder Ethanol, Butanol, Propanol, Pentanol, Hexanol oder Heptanol, Propandiol,

RECEIVED

MAR 15 1999

Erithritol, Niederalkancarbonsäureester, z.B. Essigsäurealkylester, Ether wie z.B. Diethylether, Dioxan oder Tetra-hydrofuran, oder Mischungen dieser Lösungsmittel, in Frage.

5

Übersichten der Lipide und Phospholipide, die zusätzlich zu den vorstehend genannten für eine Verwendung im Sinne dieser Anmeldung geeignet sind, sind in 'Form and Function of Phospholipids' (Ansell & Hawthorne & Dawson,

10

Verfasser), 'An Introduction to the Chemistry and Biochemistry of Fatty acids and Their Glycerides' von Gunstone und in anderen Übersichtswerken enthalten. Die erwähnten Lipide und Tenside sowie andere, in Frage kommende randaktive Stoffe, und ihre Herstellung, sind

15

bekannt. Ein Überblick der käuflich erhältlichen polaren Lipide, sowie die Warenzeichen, unter denen diese von den Herstellerfirmen vertrieben werden, ist im Jahrbuch

'Mc Cutcheon's, Emulsifiers & Detergents', Manufacturing Confectioner Publishing Co, angegeben. Ein aktuelles

20

Verzeichnis der pharmazeutisch akzeptablen Wirkstoffe ist z. B. dem 'Deutschen Arzneibuch' (und der jeweiligen Jahresausgabe der 'Rote Liste'), ferner aus British Pharmaceutical Codex, European Pharmacopoeia, Farmacopoeia Ufficiale della Repubblica Italiana, Japanese Pharmaco-

25

poeia, Nederlandse Pharmacopoeia, Pharmacopoeia Helvetica, Pharmacopoe Francaise, The United States Pharmacopoeia, The United States NF, usw., entnehmbar. Ein ausführliches

Verzeichnis der erfindungsgemäß geeigneten Enzyme ist in dem Band 'Enzymes', 3rd Edition (M. Dixon und E.C. Webb,

30

Academic, San Diego, 1979) enthalten, aktuelle Neuentwicklungen sind der Reihe 'Methods in Enzymology' zu entnehmen. Zuckererkennende Proteine, die im Zusammenhang mit dieser Erfindung interessant sind, sind in dem Buch

'The Lectins: Properties, Functions, and Applications in

35

Biology and Medicine' (I.E. Liener, N. Sharon, I.T. Goldstein, Eds. Academic, Orlando, 1986) sowie in aktuellen Fachpublikationen beschrieben; Agrotechnisch interessante



Substanzen sind in 'The Pesticide Manual' (C.R. Worthing, S.B. Walker, Eds. British Crop Protection Council, Worcestershier, England, 1986, z.B. 8th edition) und in 'Wirkstoffe in Pflanzenschutz und Schädlingsbekämpfung',  
5 herausgegeben durch den Industrie-Verband Agrar (Frankfurt) angeführt; käuflich erhältliche Antikörper sind in dem Katalog 'Linscott's Directory', die wichtigsten Neuropeptide in 'Brain Peptides' (D.T. Krieger, M.J. Brownstein, J.B. Martin, Eds. John Wiley, New York, 1983),  
10 entsprechenden Ergänzungsbänden (z.B. 1987) und anderen Fachpublikationen aufgelistet.

Herstellungstechniken für Liposome, die sich überwiegend auch für die Herstellung von Transfersomen eignen, sind in  
15 'Liposome Technology' (Gregoriadis, Ed., CRC Press) oder in älteren Nachschlagewerken, z.B. in 'Liposomes in Immunobiology' (Tom & Six, Eds., Elsevier), in 'Liposomes in Biological Systems' (Gregoriadis & Allison, Eds., Willey), in 'Targeting of Drugs' (Gregoriadis & Senior &  
20 Trouet, Plenum), usw., sowie in der einschlägigen Patentliteratur beschrieben.

Die Stabilität und Permeationafähigkeit von Transfersomen kann mittels Filtration, ggf. unter Druck, durch ein feinporiges Filter oder durch anderweitige kontrollierte mechanische Aufwirbelung, Scherung oder Zerkleinerung bestimmt werden.  
25

Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung, ohne sie zu beschränken. Temperaturen sind in Grad Celsius, Trägergrößen in Nanometer, Drucke in Pascal und sonstige Größen in üblichen SI Einheiten angegeben.  
30

Verhältnis- und Prozentangaben sind molar, sofern nicht anders angegeben. Meßtemperatur ist ca. 21°C, wenn nicht anders angegeben.  
35

RECEIVED  
JUN 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL

Beispiele 1 - 4Zusammenfassung:

5	0 - 500 mg	Phosphatidylcholin aus Soja- Bohnen CMC $\approx 10^{-7}$ M (ca. 98% PC = SPC)
10	0 - 500 mg	Distearoylglycerophosphoetha- nolamin--triazopolyethoxylen (5000) CMC = $10^{-5}$ M
	4.50 ml	Puffer, pH 7,3

15 Herstellung:

Es werden Gemische von SPC (angenommene Molmasse: 800 Da) mit zunehmenden Mengen 0, 30 und 40 Mol-% DSPE-PEG (angenommene Molmasse: 5800 Da) und reine DSPE-PEG Liposomen ohne einen Gehalt an SPC hergestellt. Anschließend werden die jeweiligen erhaltenen Gemische in einer Chloroform-Methanol-Lösung gelöst. Danach wird die Lipid-Lösung in ein Rundkolbengefäß übertragen. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer bleibt ein dünner Lipidfilm an der Kolbenwand zurück. Dieser Film wird im Vakuum (unter 10 Pa) weitergetrocknet, anschließend durch Pufferzugabe hydratisiert und durch mechanisches Rühren suspendiert. Es wird eine trübe Suspension erhalten, die in der Regel sehr viskos ist. Die Größe der Teilchen in der resultierenden Suspension wird mittels dynamischer Lichtstreuung sowie mittels optischer Mikroskopie bestimmt. Die beobachtete Teilchengröße war in allen Fällen immer größer als 0,5  $\mu\text{m}$ . Anhand der dynamischen Lichtstreuung läßt sich daher für die untersuchten Gemische eine Micellenbildung und folglich auch eine Solubilisierung ausschließen.

Die Liposomen für die Vergleichsversuche werden nach einem analogen Verfahren aus reinem Phosphatidylcholin hergestellt.

5 Bestimmung der Träger-Permeationsfähigkeit:

Eine Trägersuspension wird unter einem gegebenen äußeren Druck durch die Konstriktionen in einer künstlichen Permeationsbarriere getrieben. Die Materialmenge, die pro  
10 Zeiteinheit durch die Verengung kommt, wird volumetrisch oder gravimetrisch bestimmt. Aus der Gesamtfläche (Auftragsfläche des Materials), dem (Antriebs-)Druck, der Zeit und der Penetratmenge wird die Permeationsfähigkeit (P) der Suspension im jeweiligen untersuchten System wie folgt  
15 berechnet:

$$P = \frac{\text{Penetratmenge}}{\text{Zeit} \times \text{Fläche} \times \text{Antriebsdruck}}$$

20 Die Messung wird unabhängig für mehrere Drucke wiederholt. Aus den Ergebnissen solcher Messungen wird die relative Abhängigkeit der Permeationsfähigkeit, was ein Maß für die Trägerdeformierbarkeit ist, in Abhängigkeit vom mechanischen Streß bzw. Druck berechnet. Der Wert für eine  
25 reines SPC enthaltende hydratisierte 1%ige Lösung beträgt bei einem Druck von 0,3 MPa ungefähr  $>0,01 \mu\text{l}/\text{MPa} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^2$  (siehe Figur 3).

Die Permeationsfähigkeitsmessung für solche Versuchsreihen  
30 erfolgt bei 62°C, damit sichergestellt ist, daß beide Lipide als fluide Phase vorliegen.

Die Ergebnisse einer solchen Meßreihe für die Beispiele 1 - 4 sind in der Tabelle 1 dargestellt. Tabelle 1 zeigt,  
35 daß die Permeationsfähigkeit mit steigendem Antriebsdruck stark, nicht linear ansteigt und bei hohen Tröpfchenbelastungen (0,7 MPa) um mehrere Größenordnungen über dem

RECEIVED

MAR 15 1999

ENTREPRENEURIAL

Wert liegt, der sich bei einer niedrigeren Belastung (0,3 MPa) ergibt. Ein derartiger ausgeprägter nicht-linearer Zusammenhang gilt jedoch ausschließlich (im Sinne eines Unterscheidungskriteriums) für Transfersomen und nicht für Liposomen. Aus der Figur 3 geht deutlich hervor, daß der Wert der Permeationsfähigkeit für die letztgenannten im Vergleich zu Transfersomen um mehrere Größenordnungen kleiner. Dieser Unterschied der Permeationsfähigkeit zwischen Transfersomen und Liposomen zeigt deutlich die gegenüber Liposomen signifikant gesteigerte Penetrationsfähigkeit.

Tabelle 1

15	Proben- Endgröße beschrei- bung	Druck	Perme- ations- fähigkeit	Ausgangs- größe	
20		(MPa)	(µl/MPa s cm <sup>2</sup> )	(nm)	(nm)
25	SPC/DSPE - PEG	0,7	21,3	225,7	92,6
	70/30 mol%	0,6	18,7		94,5
	10% Lipidlg.	0,5	10,9		96,1
30	rehydratisierte Probe	0,4	2,8		96,1
		0,3	0,007		100,5
	SPC/DSPE -PEG	0,7	12,2	217,3	96,3
35	60/40 mol%	0,6	13,2		100,7
	10% Lipidlg.	0,5	12,2		120
	rehydratisierte	0,4	3,39		99,1

**RECEIVED**

33

Probe

MAR 15 1999

0,3

0,002

wenig Filtrat

DAVIDSON, DAVIDSON &amp; KAPPEL

5

Beispiele 5 - 6Zusammensetzung:

410,05 mg, 809,25 mg      Phosphatidylcholin aus Soja-  
10 Bohnen  
(reiner als 95%) CMC  $\approx 10^{-7}$  M  
289,95 mg, 190,75 mg      Didecanoylphosphatidylcholin  
CMC  $\approx 10^{-6}$   
7 ml, 10 ml      Puffer, pH 7,3

15

Herstellung:

Der jeweilige Lipidgehalt wird so gewählt, daß in der end-  
gültigen Formulierung beide Lipid-Komponenten in einem  
20 Molverhältnis von 1/1 bzw. 3/1 vorliegen. Die entsprechen-  
den Substanzmengen Phosphorlipid werden in einem 50 ml  
Rundkolben eingewogen und in jeweils 1 ml Chloro-  
form/Methanol 1:1 gelöst. Nach Entfernen des Lösungsmit-  
tels im Rotationsverdampfer wird, wie in den Beispielen  
25 1-4 zuvor beschrieben, eine Suspension aus dem Film erhal-  
ten, die Träger mit einem mittleren Radius von ungefähr  
450 nm aufweist.

Bestimmung der Träger-Permeationsfähigkeit

30

Die Bestimmung der Träger-Permeationsfähigkeit wird nach  
dem in den Beispielen 1-4 beschriebenen Verfahren durch-  
geführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in der Figur 4  
dargestellt. Sie zeigen, daß ein Zusatz von Didecanoyl-  
35 phosphatidylcholin die Permeationsfähigkeit der Träger, in  
Abhängigkeit von der Konzentration, signifikant erhöht,  
insbesondere bei hohem Druck. Die aus SPC und Didecanoyl-

phosphatidylcholin in einem Molverhältnis von 1/1 gebil-  
d ten Träger (davon ausgenommen die Träger mit einem Mol-  
verhältnis von 3/1) haben eine signifikant höhere Permea-  
tionsfähigkeit als aus reinem SPC gebildete Liposomen.

5

Die Werte der Permeationsfähigkeit für die gemessenen Trä-  
ger der Beispiele 5 - 6 sind in der Tabelle 2 zusammen-  
gefaßt.

- 10 Die reines Didecanoylphosphatidylcholin enthaltende 10%ige  
Suspension ist milchig trüb. Diese Suspension enthält  
Träger mit einem mittleren Durchmesser von  $700 \pm 150$  nm  
und bildet einen Bodensatz aus. Dieses Verhalten zeigt  
deutlich, daß das Lipid weder per se noch in Kombination  
15 mit SPC im relevanten Konzentrationsbereich solubilisier-  
bar ist.

Tabelle 2

20	Probenbeschreibung	Porendurch- messer (nm)	Druck (MPa)	Permeations- fähigkeit
25	Probe: 3 : 1	50	0,9	0,00039
			0,5	0,0083
		100	0,6	0,021
			0,7	0,04
			0,8	0,05
			0,9	0,066
30	Probe: 1 : 1	50	0,9	0,16
			0,5	0,052
		100		0,021
			0,6	0,12
				0,17
35			0,7	0,27
				0,22
			0,8	0,76

RECEIVED  
MAR 15 1999

35

0,69  
0,9 0,66  
0,60

5 DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL Beispiel 7

345,6 mg Phosphatidylcholin aus Soja-Bohnen  
(reiner als 95%, PC) CMC =  $10^{-7}$  M  
154,4 mg Distearoylphosphomaltobionamid CMC =  
10  $10^{-5}$  M  
4,5 ml Puffer, pH 7,3

Es wird gemäß dem für die Beispiele 5-6 beschriebenen  
Verfahren eine Suspension aus SPC/DSPE-Maltobionamid in  
15 einem Molverhältnis 3:1 hergestellt. Die resultierenden  
Träger weisen eine außergewöhnlich gute Permeationsfähig-  
keit auf. Bei der Bestimmung der Permeationsfähigkeit wird  
vor und nach jeder Messung die Größe der Träger bestimmt.  
Die Messungen dienen dem Nachweis, daß zu keinem Zeitpunkt  
20 eine Solubilisierung der Träger auftritt.

Die Permeationsfähigkeit der Träger wird bei einem Druck  
von 0,4 MPa und im Gegensatz zu den Beispielen 5 und 6 bei  
einer Temperatur von 52°C ermittelt. Bei diesem Druck ist  
25 die durch die künstliche Permeationsbarriere beobachtete  
Trägerpermeation ausreichend gut. Das zugesetzte Lipid  
(Glyko-Lipid) ist zur Solubilisierung des Phospholipids  
nicht fähig. Eine Untersuchung der Suspension mittels  
dynamischer Lichtstreuung sowie mittels optischer Mikros-  
30 kopie gibt keinen Hinweis auf die Existenz einer solubi-  
lisierten (mizellaren) Phase. Die Endgröße der Teilchen  
beträgt nach der Permeation durch die künstliche Permeabi-  
litätsbarriere in Abhängigkeit vom Antriebsdruck (0,3 -  
0,9 MPa; mit steigendem Druck, Tendenz fallend) zwischen  
35 98 und 81 nm.

Reines Glykolipid geht weder in Lösung noch entsteht eine Mizellensuspension, sondern es bildet sich eine Vesikelsuspension aus. Um das zu belegen, wurde ein Versuch unternommen, womit die osmotische Aktivität von DSPE im wässrigen Medium nachgewiesen werden kann. Hierfür wurde die Lipidsuspension mit Wasser verdünnt. Aufgrund des dadurch entstehenden Konzentrationsgefälles kommt es zum Eintritt von Wasser in die Vesikel. Als unmittelbare Folge nimmt der mittlere Vesikelradius meßbar zu. Dagegen verändern Teilchen ohne Innenvolumen (z.B. Mischmizellen) unter vergleichbaren Versuchsbedingungen ihre Größe nicht.

### Beispiele 8 - 17

#### 15 Zusammensetzung:

203 - 86,5 µl	Phosphatidylcholin aus Soja-Bohnen
	(als eine 1:1 Masse / V SPC-Lösung in absolutem Ethanol)
20	CMC (in Wasser) $\approx 10^{-7}$ M
9.04 - 61.4 mg	Diclofenac, Löslichkeit $\leq 10^{-5}$ M
1 ml	Phosphatpuffer (nominal: pH 6,5)
25	

Die Träger werden nach dem in den Beispielen 1-4 beschriebenen Verfahren als SPC-/Diclofenac-Gemischen in einem Molverhältnis von 4:1 bis 1:4 hergestellt.

30

Die so erhaltenen Gemische werden einer Ultraschallquelle solange ausgesetzt, bis die Proben makroskopisch klar sind (ungefähr 4 Minuten). Danach werden die Lösungen 15 min bei 15.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die resultierenden Lösungen 1:1 - 1:4 sind nicht klar (Figur 5), sondern zeigen eine Opaleszenz. Dagegen weisen die Gemische 4:1, 3:1 und 2:1 einen deutlichen Niederschlag auf. Nach

35



5-minütigen Stehenlassen trüben auch die anderen Suspensionen ein, wobei bei den Gemischen 1:2, 1:3 und 1:4 ein flockiger Niederschlag ausfällt (Tabelle 3). Dieses Verhalten zeigen die Präparate auch nach Einstellen des pH's (mit HCl) auf Werte zwischen pH 7 - pH 7,2.

#### Bestimmung der Träger-Permeationsfähigkeit:

Die Träger-Permeationsfähigkeit, die ein Maß für die Trägerdeformierbarkeit ist, wird wie in den vorangegangenen Beispielen beschrieben, bestimmt. Dabei wird für die Gemische mit 15 mg/ml, 20 mg/ml und 25 mg/ml Diclofenac bei einem Druck von 0,3 MPa (Antriebsdruck) folgende Permeabilitätswerte (P) erhalten:  $6 \times 10^{-11}$  m/Pa/s,  $10^{-10}$  m/Pa/s und  $2,5 \times 10^{-10}$  m/Pa/s.

Diese Werte sind mit denen bekannter Transfersomen, die unter ähnlichen Bedingungen gemessen wurden (SPC/NaChol 3/1 M/M; 2 Gew.-%:  $3 \times 10^{-10}$  m/Pa/s), vergleichbar. Das belegt, daß SPC/Diclo-fenac-Gemische geeigneter Zusammensetzung eine sehr hohe Permeationsfähigkeit aufweisen und folglich extrem deformierbar sein müssen, obwohl sie zu keinem Zeit- oder Konzentrationspunkt solubilisierbar sind.

#### TABELLE 3

Mit HCl wird der pH auf 7 - 7,2 pH eingestellt und 2 min beschallt.

Nach Beschallen:	1:1.0	leicht trüb
	1:1.2	trüb, flüssig, Kristalle in Lsg. ca. 20 pro Sichtfeld
	1:1.4	trüb, flüssig, Kristalle in Lsg. ca. 20 pro Sichtfeld

RECEIVED

MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL

5	1:1.6	trüb, flüssig, Kristalle etwas größer
	1:1.8	trüb, zähflüssig, Zusammenballung von Kristallen
	1:2.0	trüb, zähflüssig, sehr viele Kristalle
	1:2.2	trüb, zähflüssig, sehr viele, sehr große Kristalle

10

Beispiele 18 - 25:Zusammensetzung:

15	475 - 325 mg	Phosphatidylcholin aus Soja- Bohnen CMC $\approx 10^{-7}$ M
	25 - 175 mg	Ibuprofen, Löslichkeit $\leq 5 \times 10^{-5}$ M
	5 ml	Puffer, pH 6.5

20

Herstellung:

Die Herstellung erfolgt wie in den Beispielen 1-4 beschrieben, mit der Ausnahme, daß der pH-Wert nach Suspensionierung des Gemisches durch Zugabe von 10 M NaOH auf pH 7 eingestellt wird. Es werden jeweils 5 ml ibuprofenhaltige Transfersomen mit zunehmender Menge an Ibuprofen und abnehmender Menge an SPC (in 25 mg-Schritten) hergestellt, worin die Gesamtlipidkonzentration 10% beträgt.

30

Mikroskopische Kontrolle der erhaltenen Suspensionen:

	Probe 1:	keine Kristalle, sehr große Träger;
35	Probe 2:	keine Kristalle, sehr große Träger;
	Probe 3:	im Hintergrund nur Flimmern;
	Probe 4:	sehr vereinzelt kleine Kristalle;

- Probe 5: keine Kristalle, Tröpfchen;  
Probe 6: überwiegend Kristalle;  
Probe 7: Tröpfchen, vereinzelt sehr große  
Kristalle.

**RECEIVED**

MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON &amp; KAPPEL

5

Bestimmung der Träger-Permeationsfähigkeit:

- Die Bestimmung der Träger-Permeationsfähigkeit wird, wie  
in den vorherigen Beispielen beschrieben, durchgeführt.  
10 Die Ergebnisse dieser Messung sind in den Figuren 6 und 7  
dargestellt. Die untersuchten Phospholipid-Wirkstoffge-  
mische zeigen durchgehend insbesondere aber im Konzen-  
trationsbereich von 35 mg Ibuprofen/ml und darüber, ein  
für Transfersomen typisches Verhalten. Die Ibuprofen-  
15 Konzentration der Träger bewirkt keine Solubilisierung.

Vergleichsbeispiele A - E

- 20 Vergleichsbeispiel A (Beispiel 2 aus EP-A 0 211 647)

Zusammensetzung:

- |          |  |
|----------|--|
| 120 mg   | Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC)                   |
| 25 24 mg | Ölsäure  |
| 20 mg    | Arginin  |
| 60 ml    | PBS (eine Tablette in 200 ml dest. Wasser<br>auflösen) |

- 30 Es wurden 120,0 mg DPPC und 24,1 mg Ölsäure in ein 100 ml  
Becherglas eingewogen. Anschließend wurden die beiden Rea-  
genzien vermischt. Eine Phosphatpuffersalz (PBS)-Tablette  
wurde in 200 ml dest. Wasser vollständig aufgelöst, um  
einen 10 mM (PBS)-Puffer zu erhalten. Dann wurden 20 mg  
35 Arginin in 60 ml PBS, mit einem pH-Wert 7,46 gelöst und  
dem Lipid-Gemisch zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde  
für eine halbe Stunde auf 40-45°C erhitzt und homogen

Vergleichsbeispiel B (Beispiel 9 aus EP-A 0 280 492)

	270 mg	Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC)
5	30 mg	DSPC
	60 mg	1-Octadecansulfonsäure (ODS)

Es wurden 270,05 mg (DPPC), 30,1 mg DSPC und 60,01 mg 1-Octadecansulfonsäure (ODS) in Chloroform/Methanol 1:1  
10 gelöst. Die Probe wurde für zwei Stunden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Anschließend wurde im Vakuum noch für eine Stunde nachgetrocknet. Der Rückstand wurde mit 10 ml PBS rehydriert. Die Mischung wurde auf  
60°C erwärmt und homogenisiert. Danach wurde die Probe für  
15 5 Minuten einer Ultraschallquelle ausgesetzt.

Vergleichsbeispiel C (Beispiel 7 aus WO 88/07362):20 Zusammensetzung:

	400 mg	Setacin F spezial-Paste (Disodiumlaurylsulfo- succinat)
	580 mg	hydrogeniertes PC (PHPC)
25	200 mg	Minoxidil Acetatpuffer pH 5,5

Es wurden 400 mg Setacin F Spezial-Paste, 580,03 mg PHPC und 200,03 mg Minoxidil in einem Becherglas eingewogen und  
30 mit Chloroform/Methanol 1:1 gelöst und in einen Rundkolben überführt. Das Lipidgemisch wurde am Rotationsverdampfer für ca. 2,5 Stunden eingengt und anschließend im Vakuum vollständig getrocknet. Dann wurde die Probe bei 50°C im warmen Wasserbad geschwenkt und mit 10 ml Acetatpuffer  
35 rehydratisiert. Nach vollständiger Lösung wurde die Lösung für eine Stunde im Wasserbadschüttler stehen gelassen.

Als Antioxidans wurde 1 mg D feroxamin-Mesylat zugegeben. Dann wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 Tropfen 10 mM HCl auf einen pH-Wert von ca. 7,24 eingestellt. Die Lösung ließ sich bei einer Wasserbadtemperatur von 35°C unter Rühren makroskopisch homogenisieren.

Vergleichsbeispiel D (Beispiel 4 aus EP-A 0 220 797)

Zusammensetzung:

10

400 mg	gereinigtes hydriertes Sojabohnen-Lecithin
40 mg	HCO-60 (Polyoxyethylen hydriertes Rhizinusöl)
100 mg	Vitamin E
15 9,46 ml	bidest. Wasser

Es wurden 400,04 mg Phospholipon 90 H (hydriertes Sojabohnenlecithin), 40 mg Eumulgin HRE 60 (Polyoxyethylenhydriertes Rhizinusöl) und 100,11 mg Vitamin E in ein 100 ml Becherglas eingewogen und mit 9,46 ml bidest. Wasser aufgefüllt. Die Probe wurde 45 Minuten, bis fast alles gelöst war, gerührt. Dann wurde die Lipidlösung für 10 Minuten bei 79°C im Ultraschallbad beschallt. Zur vollständigen Lösung wurde die Probe nochmals gerührt und für 10 Minuten bei 56°C im Ultraschallbad beschallt.

Vergleichsbeispiel E (Beispiel 2 aus EP-A 0 102 324)

Zusammensetzung:

30

300 mg	SPC
150 mg	Octadecyltrimethylammoniumbromid
2550 µl	dest. Wasser

35 Es wurden 300 mg SPC und 150 mg Octadecyltrimethylammoniumbromid in ein 100 ml Becherglas eingewogen und mit 1 ml Chloroform/Methanol 1:1 gelöst.

RECEIVED

5 1999

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL

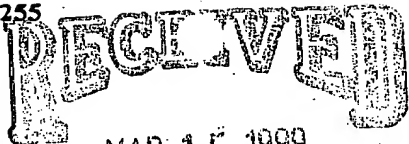
Die Probe wurde im Vakuum bis zur Trocknung eingeengt. Durch Hinzugabe von dest. Wasser wurde eine 1%ige Lösung hergestellt. Die erhaltene Lösung wurde 15 Minuten g - rührt.

5

Die Probenzubereitungen der Vergleichsbeispiele A-E wurden (wenn nicht anders angegeben) den jeweiligen Vorschriften in den genannten Druckschriften entsprechend durchgeführt.

- 10 In Figur 8 ist in Form einer Balkengraphik die Permeationsfähigkeit (bei einem konstanten Druck von 0,9 MPa) für die Vergleichsbeispiele A-E und für ein erfindungsgemäßes Ibuprofen-/SPC-Transfersom aufgeführt. Aus der Balkengraphik (Figur 8) geht deutlich hervor, daß die
- 15 Zusammensetzungen der Vergleichsbeispiele A bis E bei höherem Druck (0,9 MPa) im Vergleich zu erfindungsgemäßen Transfersomen eine signifikant geringere Permeationsfähigkeit aufweisen.

20

Patentansprüche

DAVIDSON, DAVIDSON &amp; KAPPEL

1. Präparate zur Applikation bzw. zum Transport von w -  
5 nigstens einem Wirkstoff, insbesondere für medizini-  
sche oder biologische Zwecke, in und durch Barrieren  
und Konstriktionen wie Häute und dergleichen, in Form  
10 von in einem flüssigen Medium suspendierbaren Flüs-  
sigkeitströpfchen, die mit einer membranartigen Hülle  
aus einer oder wenigen Lagen amphiphiler Trägersub-  
stanz versehen sind, wobei die Trägersubstanz wenig-  
stens zwei (physiko)-chemisch verschiedene Kompo-  
nenten umfaßt,  
dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens zwei Kompo-  
15 nenten vorgesehen sind, die sich in ihrer Löslichkeit  
im Suspensionsmedium der Präparate, üblicherweise  
Wasser, um einen Faktor von mindestens 10 unterschei-  
den, und der Gehalt solubilisierender Komponenten  
weniger als 0,1 Mol.-%, bezogen auf den Gehalt an  
20 diesen Substanzen, beträgt, bei dem der Solubilisie-  
rungspunkt der umhüllten Tröpfchen erreicht wird oder  
aber dieser Solubilisierungspunkt nicht erreicht wer-  
den kann.
- 25 2. Präparat nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphilen Komponen-  
ten so ausgewählt sind, daß konzentrationsunabhängig  
keine Solubilisierung erfolgt.
- 30 3. Präparat nach einem der Ansprüche 1 und 2,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Löslichkeit, insbe-  
sonders die Wasserlöslichkeit der löslicheren Kom-  
ponente(n) mindestens  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  M und die  
Löslichkeit, insbesondere die Wasserlöslichkeit der  
35 weniger löslichen Komponente(n) mindestens  
 $10^{-6}$  bis  $10^{-10}$  M beträgt.

4. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß der Löslichkeitsunter-  
schied der löslicheren Komponente(n) und der weniger  
löslichen Komponente(n) ungefähr zwischen  $10^0$  und  $10^7$ ,  
vorzugsweise zwischen  $10^2$  und  $10^6$  und besonders be-  
vorzugt zwischen  $10^3$  und  $10^5$  beträgt.
5. Präparat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Fähigkeit des Präpa-  
rates, durch Konstriktionen zu permieren, mindestens  
0,01 Promille, vorzugsweise 1 Promille, der Permeabi-  
lität von kleinen, im wesentlichen ungehindert per-  
meierenden Molekülen beträgt.
6. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis der Per-  
meationsfähigkeit gegenüber Referenzteilchen  
 $P_{\text{(Transf.)}}/P_{\text{(Refer)}}$ , wobei die Referenzteilchen,  
beispielsweise Wasser, viel kleiner sind als die  
Konstriktionen in der Barriere, wenn die Barriere  
selbst der Bestimmungsort ist, zwischen  $10^{-5}$  und 1,  
vorzugsweise zwischen  $10^{-4}$  und 1 und besonders  
bevorzugt zwischen  $10^{-2}$  und 1 liegt.
7. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat einen Gehalt  
von mindestens zwei amphiphilen Komponenten unter-  
schiedlicher Löslichkeit, zur Bildung einer Träger-  
substanz und/oder einer membranartigen Hülle um eine  
Tröpfchenmenge hydrophiler Flüssigkeit umfaßt, worin  
der Wirkstoff in der Trägersubstanz, in oder an der  
membranartigen Hülle und/oder in der hydrophilen  
Flüssigkeit enthalten ist.
8. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet, daß der Vesikelradius der



umhüllten Tröpfchen zwischen ungefähr 25 und ungefähr 500 nm, vorzugsweise zwischen ungefähr 50 und ungefähr 200 nm, besonders bevorzugt zwischen ungefähr 80 und ungefähr 180 nm liegt.

5

9. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Umhüllung eine Doppelschicht ist.

10

10. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphile Komponente(n) physiologisch verträgliche Lipide unterschiedlicher Polarität und/oder solche Wirkstoff(e) umfaßt.

15

11. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphile Substanz ein Lipid oder Lipoid biologischer Herkunft oder ein entsprechendes synthetisches Lipid bzw. ein Derivat solcher Lipide ist, insbesondere Diacyl- oder Dialkyl-glycerophosphoethanolaminazopolyethoxylen-derivat, Didecanoylphosphatidylcholin, Diacyl-phosphooligomaltobionamid, ein Glycerid, Glycerophospholipid, Isoprenoidlipid, Sphingolipid, Steroid, Sterin oder Sterol, ein schwefel- oder kohlenhydrathaltiges Lipid, oder aber ein anderes Lipid, das stabile Strukturen, z. B. Doppelschichten bildet, vorzugsweise eine halb protonierte fluide Fettsäure, insbesondere ein Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol, eine Phosphatidsäure, ein Phosphatidylserin, ein Sphingomyelin oder Sphingophospholipid, Glykosphingolipid (z.B. Cerebrosid, Ceramidpolyhexosid, Sulfatid, Sphingoplasmalogen), Gangliosid oder anderes Glykolipid umfaßt, oder ein synthetisches Lipid, vorzugsweise ein Dioleoyl-, Dilinoyl-, Dilinolenyl-, Dilinoloyl-, Dilinolinayl-,

20

25

30

35

RECEIVED  
MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON & KADDEI

5 Diarachinoyl-, Dilauroyl, Dimyristoyl-, Dilalmitoyl-, Distearoylphospholipid oder ein entsprechendes Dialkyl- bzw. Sphingosinderivat, Glykolipid oder anderes gleich- oder gemischtkettiges Acyl- bzw. Alkyl-Lipid umfaßt.

10 12. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die weniger lösliche amphiphile Komponente ein synthetisches Lipid, vorzugsweise Myristoleoyl-, Palmitoleoyl-, Petroselinyl-, Petroselaidyl-, Oleoyl-, Elaidyl-,  
15 cis- bzw. trans-Vaccenoyl-, Linolyl-, Linolenyl-, Linolaidyl-, Octadecatetraenoyl-, Gondoyl-, Eicosaenoyl-, Eicosadienoyl-, Eicosatrienoyl-, Arachidoyl-, cis- bzw. trans-Docosae-  
20 noyl-, Docosatrienoyl-, Docosatetraenoyl-, Caproyl-, Lauroyl-, Tridecanoyl-, Myristoyl-, Pentadecanoyl-, Palmitoyl-, Heptadecanoyl-, Stearoyl- bzw. Nonadecanoyl-, glycerophospholipid bzw. ein entsprechend kettenverzweigtes Derivat oder ein entsprechendes Sphingosinderivat, Glykolipid oder anderes Acyl- bzw. Alkyl-Lipid umfaßt; und die besser lösliche amphiphile Komponente(n) von einer der oben  
25 aufgeführten weniger löslichen Komponente abgeleitet ist und zur Erhöhung der Löslichkeit mit einem Butanoyl-, Pentanoyl-, Hexanoyl-, Heptanoyl-, Octanoyl-, Nonanoyl-, Decanoyl-, Dodecan oder Undecanoyl oder einem entsprechend einfach oder mehrfach ungesättigten bzw. kettenverzweigten Substitu-  
30 enten davon oder mehreren unabhängig voneinander ausgewählte Substituenten derivatisiert ist und/oder mit einem anderen zur Verbesserung der Löslichkeit geeigneten Stoff substituiert, komplexiert und/oder assoziiert ist.

35

13. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Gesamtgehalt an

amphiphiler Substanz zur Applikation auf menschlicher und tierischer Haut zwischen 0,01 und 40 Gew.-% d s Präparates, vorzugsweise zwischen 0,1 und 15 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 1 und 10 Gew.-% beträgt.

14. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Gesamtgehalt an amphiphiler Substanz zur Applikation bei Pflanzen 0,000001 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise zwischen 0,001 und 1 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 0,01 und 0,1 Gew.-% beträgt.

15. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff ein Adrenocorticiostaticum,  $\beta$ -Adrenolyticum, Androgen oder Antiandrogen, Antiparasiticum, Anabolicum, Anästheticum oder Analgesicum, Analepticum, Antiallergicum, Antiarrhythmicum, Antiarteroscleroticum, Antiasthmaticum und/oder Bronchospasmolyticum, Antibioticum, Antidepressivum und/oder Antipsychoticum, Antidiabeticum, Antidotum, Antiemeticum, Antiepilepticum, Antifibrinolyticum, Anticonvulsivum, Anticholinergicum, Enzym, Koenzym oder ein entsprechender Inhibitor, ein Antihistaminicum, Antihypertonicum, einen biologischen Aktivitätsinhibitor, ein Antihypotonicum, Antikoagulans, Antimycoticum, Antimyasthenicum, einen Wirkstoff gegen morbus Parkinson oder Alzheimer, ein Antiphlogisticum, Antipyreticum, Antirheumaticum, Antisepticum, Atemanalepticum oder Atemstimulanz, Broncholyticum, Cardi tonicum, Chemotherapeuticum, einen Coronardilatator, ein Cytostaticum, Diureticum, einen Ganglienblocker, ein Glucocorticoid, Grippetherapeuticum, Hämostaticum, Hypnoticum, Immunglobulin bzw. -fragment oder eine andere immunologische bzw. Rezeptor-Substanz, ein bioaktives Kohlehydrat(derivat), ein

RECEIVED

MAR 15 1999

- Kontrazeptivum, ein Migränemittel, ein Mineral-corticoid, einen Morphin-Antagonisten, ein Muskel-relaxans, Narcoticum, Neural- oder CNS-Therapeuticum, ein Nukleotid oder ein Polynukleotid, ein Neurolepticum, einen Neurotransmitter oder entsprechenden Antagonisten, ein Peptid (derivat), ein Ophthalmicum, (Para)-Sympaticomimeticum oder (Para)-Sympathicolyticum, ein Protein(derivat), ein Psoriasis/Neurodermismittel, Mydriaticum, Psychostimulanz,
- 5 Rhinologicum, Schlafmittel oder dessen Antagonisten, ein Sedativum, Spasmolyticum, Tuberlostaticum, Urologicum, einen Vasoconstrictor oder -dilator, ein Virusstaticum oder ein Wundenheilmittel oder mehrere solcher Agentien, insbesondere Diclofenac bzw.
- 10 Ibuprofen, enthält.
- 15
16. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein nicht-steroidales Antiinflammatoricum, beispielsweise
- 20 Diclofenac, Ibuprofen oder ein Lithium-, Natrium-, Kalium-, Cäsium-, Rubidium-, Ammonium-, Monomethyl-, Dimethyl-, Trimethylammonium- oder Ethylammonium-Salz davon ist.
- 25 17. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die weniger polare Komponente ein physiologisch verträgliches Lipid, bevorzugt aus der Klasse der Phospholipide, besonders bevorzugt aus der Klasse der Phosphatidylcholine,
- 30 umfaßt und der Wirkstoff die löslichere Komponente ist, gegebenenfalls mit einem Zusatz von weniger als 10 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtzusammensetzung des Präparates einer weiteren löslichen Komponente, die löslichere Komponente ist, wobei die Konzentration
- 35 der löslicheren Komponente(n) typischerweise zwischen 0,01 Gew.-% und 15 Gew.-%, bevorzugt zwischen 0,1 Gew.-% und 10 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen

0,5 Gew.-% und 3 Gew.-%, und die Gesamtlipidkonzentration zwischen 0,005 Gew.-% und 40 Gew.-%, bevorzugt zwischen 0,5 Gew.-% und 15 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 1 Gew.-% und 10 Gew.-% beträgt.

5

18. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat Konsistenzbildner, wie Hydrogele, Antioxidantien wie Probucol, Tocopherol, BHT, Ascorbinsäure, Desferroxamin und/oder Stabilisatoren wie Phenol, Cresol, Benzylalkohol und dergleichen umfaßt.

10

19. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine wachstumsbeeinflussende Substanz für Lebewesen ist.

15

20. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff biozide Eigenschaften hat, insbesondere ein Insektizid, Pestizid, Herbizid oder Fungizid ist.

20

21. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Lockstoff, insbesondere ein Pheromon ist.

25

22. Verfahren zur Herstellung eines Präparates, zur Applikation bzw. Transport von wenigstens einem Wirkstoff, insbesondere für medizinische oder biologische Zwecke, in und durch natürliche Barrieren und Konstriktionen wie Häute und dergleichen in Form von in einem flüssigen Medium suspendierbaren Flüssigkeitströpfchen, die mit einer membranartigen Hülle aus einer oder wenigen Lagen amphiphiler Trägersubstanz versehen sind, wobei die Trägersubstanz wenigstens zwei (physiko)chemisch verschiedene Komponenten

30

35

RECEIVED

MAR 15 1999

RECEIVED

umfaßt,

dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens zwei amphiphile Komponenten ausgewählt werden, die sich in ihrer Löslichkeit im Suspensionsmedium des Präparats, üblicherweise Wasser, um einen Faktor von mindestens 10 unterscheiden, und der Gehalt solubilisierender Komponenten weniger als 0,1 Mol.-%, bezogen auf den Gehalt an diesen Substanzen, beträgt, bei dem der Solubilisierungspunkt der umhüllten Tröpfchen erreicht wird, oder aber dieser Punkt im praktisch relevanten Bereich nicht erreicht werden kann, und der Gehalt an amphiphilen Komponenten so eingestellt wird, daß die Fähigkeit des Präparates durch Konstruktionen zu permeieren mindestens 0,01 Tausendstel der Permeabilität von kleinen Molekülen, beispielsweise Wasser, beträgt.

23. Verfahren nach Anspruch 22,

dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt der amphiphilen Komponenten so eingestellt wird, daß das Verhältnis der Permeationsfähigkeit gegenüber Referenzteilchen, welche viel kleiner sind als die Konstriktionen in der Barriere, beispielsweise Wasser, wenn die Barriere selbst der Bestimmungsort ist, zwischen  $10^{-5}$  und 1, vorzugsweise zwischen  $10^{-4}$  und 1, besonders bevorzugt zwischen  $10^{-2}$  und 1 beträgt.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 und 23,

dadurch gekennzeichnet, daß man Stabilität und Permeationsfähigkeit mittels Filtration, ggf. unter Druck, durch ein feinporiges Filter oder durch anderweitige kontrollierte mechanische Aufwirbelung, Scherung oder Zerkleinerung bestimmt.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24,

dadurch gekennzeichnet, daß das Substanzgemisch, zur

Erzeugung eines transfersomenartigen Präparats, einer Filtration, Ultraschallbehandlung, Rühren, Schütteln oder anderen mechanischen Zerteilungseinwirkungen ausgesetzt wird.

5

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß man aus wenigstens zwei amphiphilen Komponenten unterschiedlicher Polarität, wenigstens einer polaren Flüssigkeit und wenigstens einem Wirkstoff transfersomenartige Tröpfchen erzeugt, die das Präparat bilden.

10

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß man aus wenigstens zwei amphiphilen Komponenten unterschiedlicher Polarität und wenigstens einer polaren Flüssigkeit transfersomenartige Tröpfchen erzeugt, die das Präparat bilden, worin die amphiphile Komponente(n) den Wirkstoff umfaßt oder beinhaltet.

15

20

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß man separat jeweils die amphiphilen Komponenten und die hydrophile Substanz mit dem Wirkstoff vermischt und ggf. zur Lösung bringt, die Gemische bzw. Lösungen dann zu einer Mischung zusammenführt und in dieser durch Zufuhr von insbesondere mechanischer Energie die Tröpfchenbildung bewirkt.

25

30

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphilen Komponenten entweder als solche oder gelöst in einem physiologisch verträglichen, mit polarer Flüssigkeit(en), insbesondere Wasser mischbaren Lösungsmittel oder Lösungsvermittler mit einer polaren Lösung zusammengegeben werden.

35

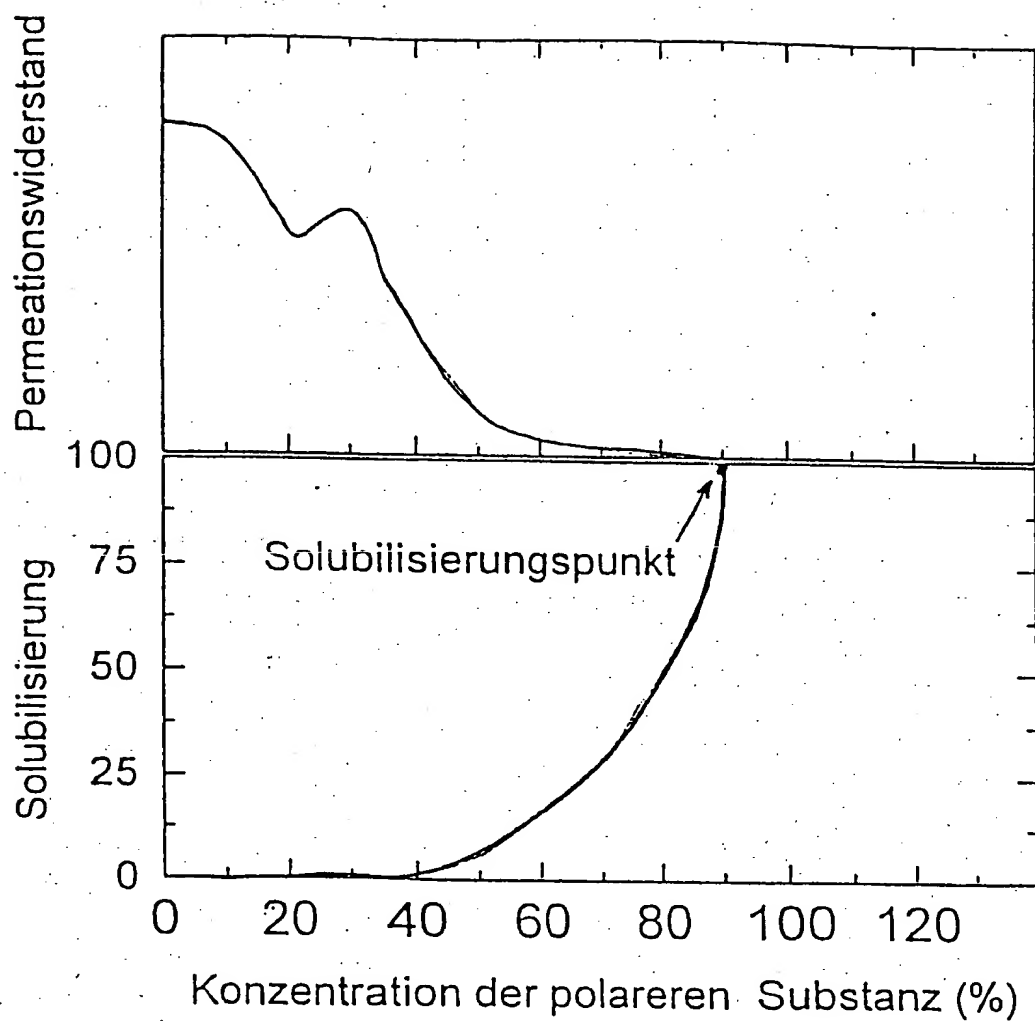
RECEIVED

MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 29,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Bildung der umhüllten  
Tröpfchen durch Einrühren, mittels Verdampfung aus  
einer Umkehrphase, durch ein Injektions- oder  
Dialyseverfahren, durch elektrische, thermische oder  
mechanische Beanspruchung wie Schütteln, Rühren,  
Homogenisieren, Ultraschall, Reiben, Frieren bzw.  
Auftauen, Heizen oder Kühlen oder Hoch- oder Nieder-  
druck-Filtration herbeigeführt wird.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 30,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Bildung der umhüllten  
Tröpfchen durch Filtration bewirkt wird und das  
Filtermaterial eine Porengröße von 0,01 bis 0,8  $\mu\text{m}$ ,  
insbesondere 0,05 bis 0,3  $\mu\text{m}$  und besonders bevorzugt  
0,08 bis 0,15  $\mu\text{m}$  aufweist, wobei ggf. mehrere Filter  
hintereinander geschaltet verwendet werden.
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 31,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Träger-Wirkstoff-  
assoziation wenigstens teilweise nach der Tröpfchen-  
bildung erfolgt.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 32,  
dadurch gekennzeichnet, daß die umhüllten Tröpfchen  
kurz vor der Anwendung aus einem Konzentrat oder  
Lyophilisat zubereitet werden.



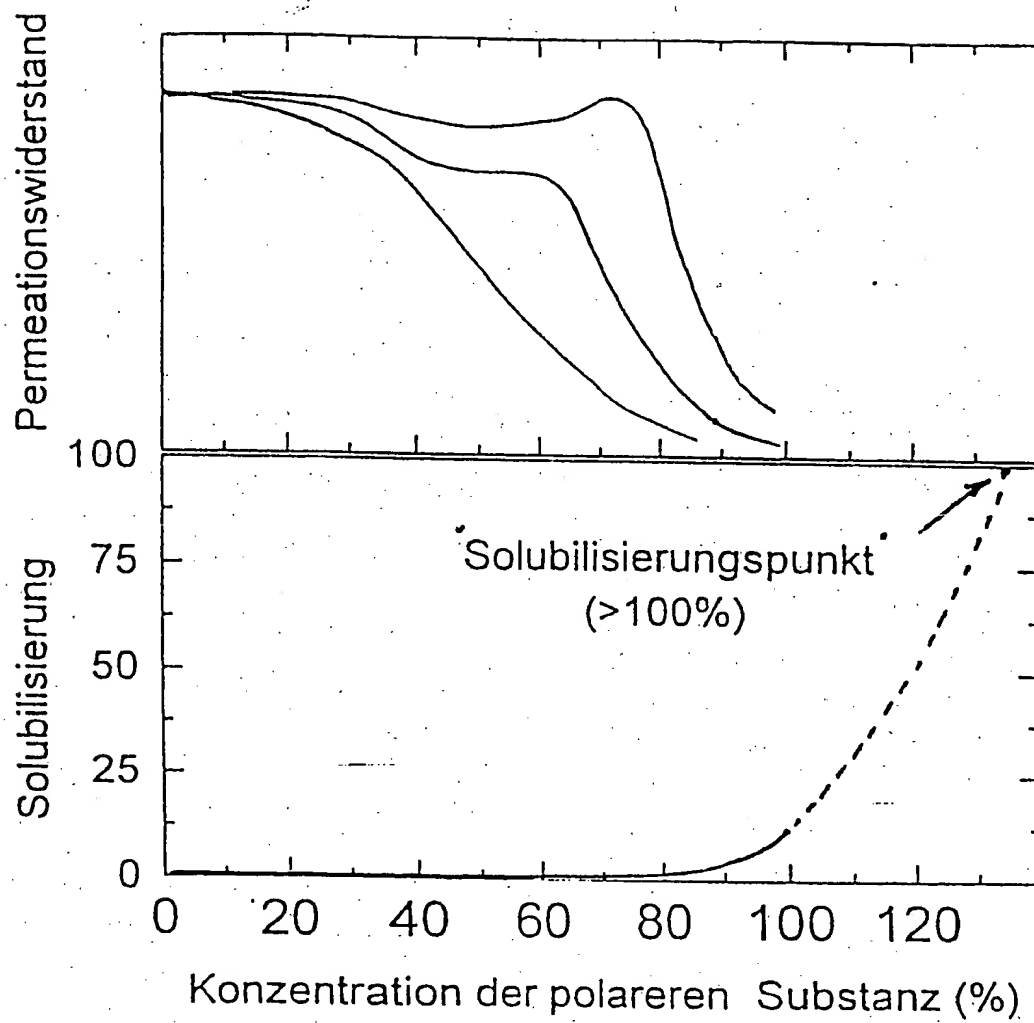
FIGUR 1**RECEIVED**

MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON &amp; KAPPEL

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/7



FIGUR 2

RECEIVED

MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON &amp; KAPPEL

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**RECEIVED**

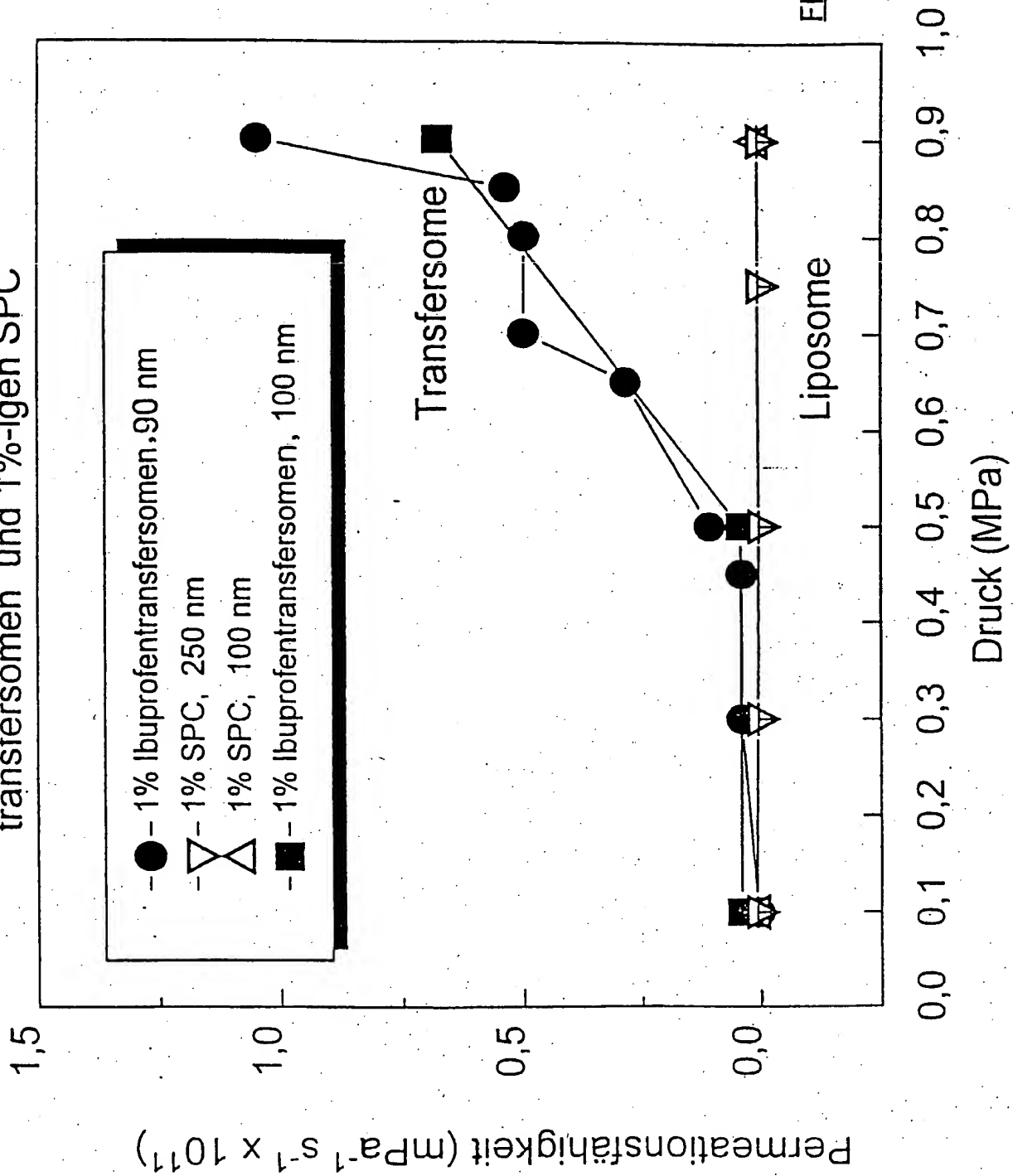
MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL

3 / 7

FIGUR 3

Permeationsmessungen mit 1%-igen Ibuprofen-  
transfersomen und 1%-igen SPC



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

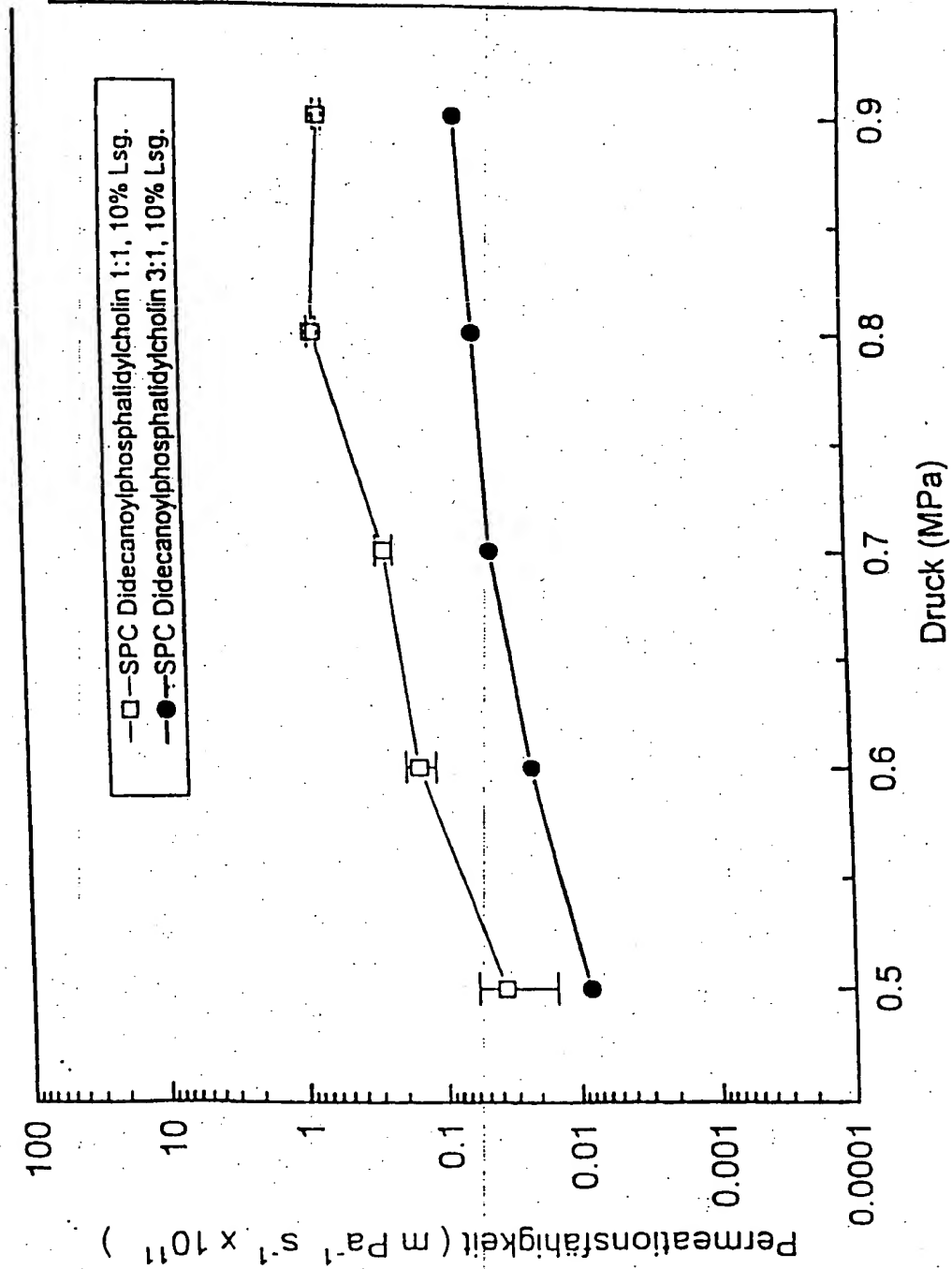
RECEIVED

MAR 15 1999

4/7

DAVIDSON, DAVIDSON &amp; KAPPEL

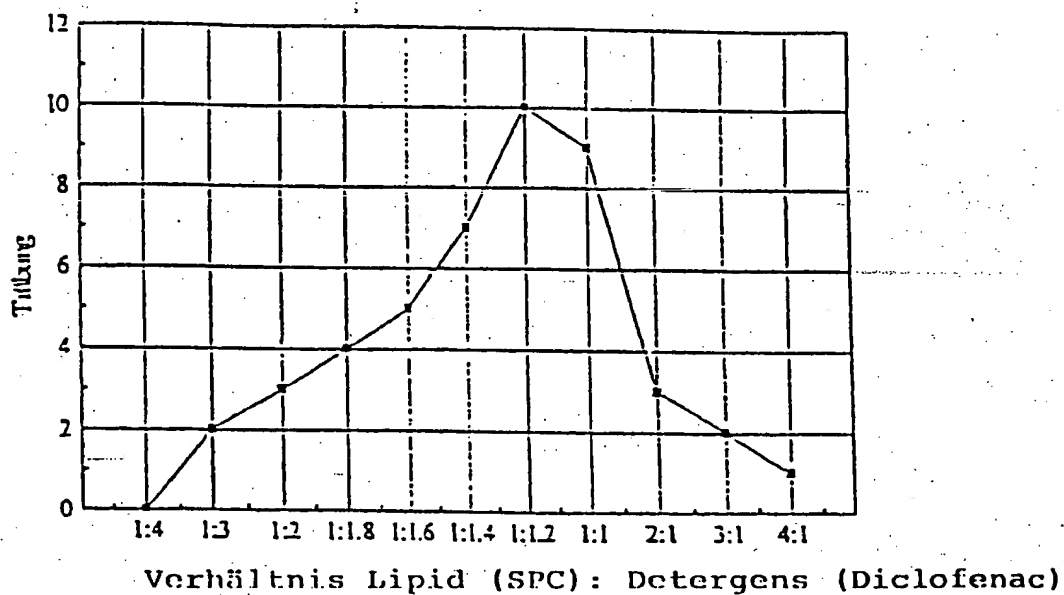
FIGUR 4



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Trübungsmessung per Auge von diclofenachaltigen  
Transfersomen mit unterschiedlichen Verhältnissen  
von Lipid zu Detergens



FIGUR 5

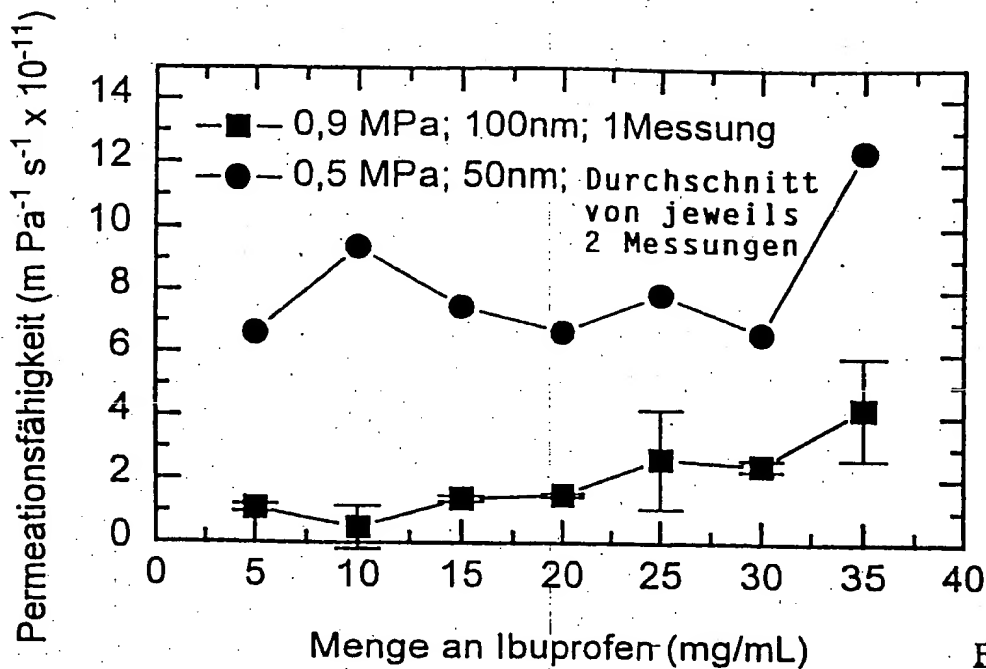
RECEIVED

MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

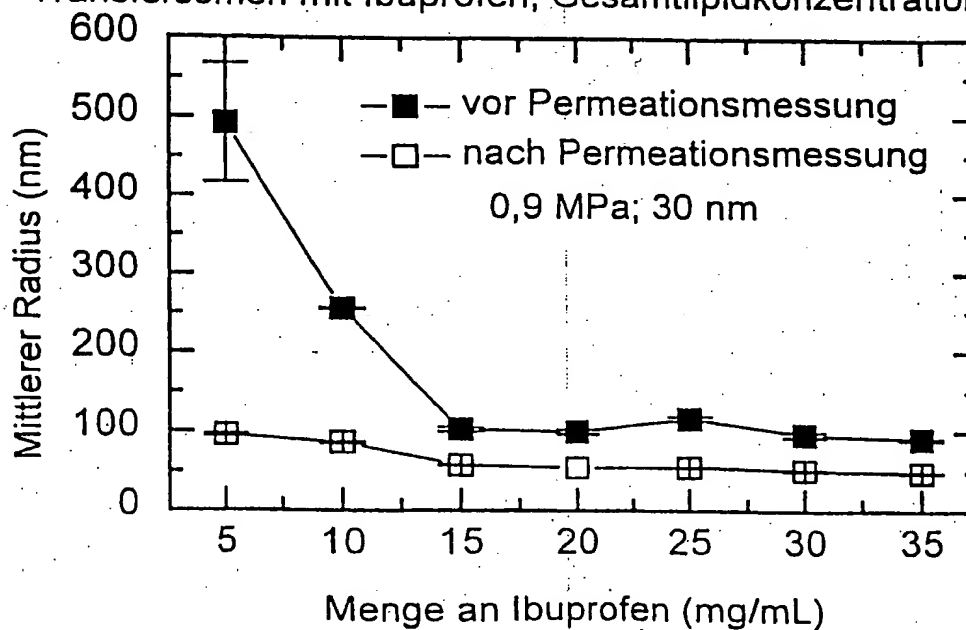
DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL / 7



FIGUR 6

Die Teilchengröße wird durch dynamische Lichtstreuung bestimmt.

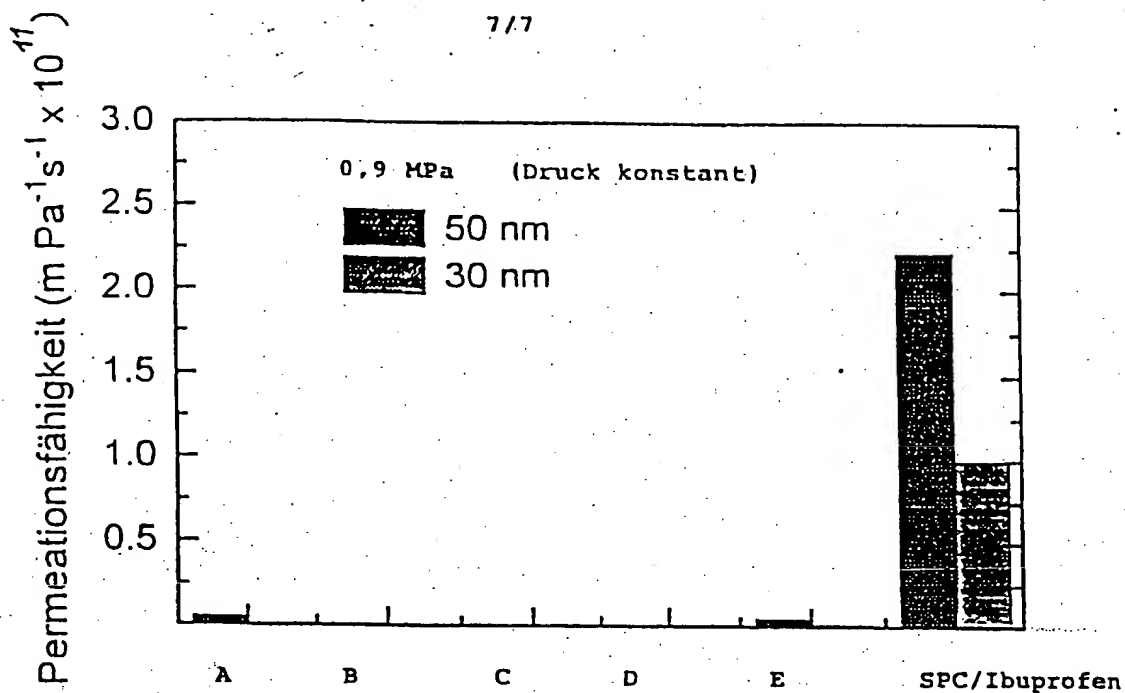
Transfersomen mit Ibuprofen; Gesamtlipidkonzentration: 10%



FIGUR 7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7/7



FIGUR 8

RECEIVED

MAR 15 1999

DAVIDSON, DAVIDSON &amp; KAPPEL

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**